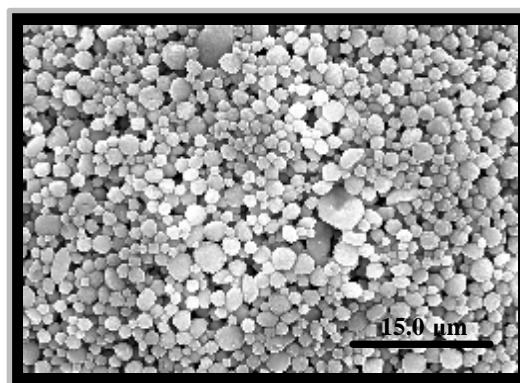




**Catarina Ferreira dos
Santos**

**Materiais fosfocálcicos para utilização em sistemas
de libertação de fármacos**

DOCUMENTO PROVISÓRIO





**Catarina Ferreira dos
Santos**

**Materiais fosfo-cálcicos para utilização em sistemas
de libertação de fármacos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Materiais, realizada sob a orientação científica da Dr.^a Maria Elisabete J.V. Costa e da Dr.^a Maria Margarida T. L. Almeida, Professoras Auxiliares do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da Comunidade
Europeia no âmbito do Projecto *Tissue
Reactor* (G5RD-CT2000-00282)

o júri

presidente

Prof. Dr. Joaquim Manuel Vieira
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Fernando Jorge Mendes Monteiro
Professor Catedrático da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Prof^a. Dr^a. Benilde de Jesus Vieira Saramago
Professora Associada do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

Prof^a. Dr^a. Maria Elisabete Jorge Vieira da Costa
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof^a. Dr^a. Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Gostaria de agradecer o apoio prestado na realização desta tese, a variadas pessoas mas neste pequeno texto não me é possível nomear todas elas, por essa razão deixo aqui os meus sinceros agradecimentos e um muito obrigado a todas as pessoas que me rodearam e que de alguma forma me ajudaram a construir esta tese.

Para começar gostaria de dizer que estou muito grata à minha orientadora Prof.^a Maria Elisabete Jorge Vieira da Costa pelo seu encorajamento e apoio contínuo prestado no processo de interpretação e discussão dos resultados ao longo de todo o tempo de realização desta tese, bem como o seu empenhamento na correcção criteriosa e minuciosa desta tese. Estou também muito grata à minha orientadora Prof.^a Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida pelo apoio prestado na revisão da tese.

Queria também agradecer a Universidade de Aveiro por permitir a elaboração deste trabalho e a União Europeia pelo seu apoio financeiro pela atribuição de uma bolsa de Mestrado do projecto *Tissue Reactor* (G5RD-CT2000-00282).

Agradeço ainda a todos os meus colegas que já trabalharam no terceiro piso do departamento de Cerâmica e do Vidro e aos que trabalham, por todo o apoio prestado com especial gratidão a Cristina, ao Manuel e ao Dimitri pelo excelente ambiente de trabalho que propiciaram bem como pela amizade demonstrada.

Estou igualmente grata a todos os meus colegas de mestrado (Sofia, Cláudia, Nuno, Victor, David, Liliana, Pedro...) que me ajudaram e apoiaram na realização das disciplinas do mestrado.

Por fim gostaria de fazer um agradecimento especial à minha família por terem acreditado que seria possível a realização desta tese e por toda a dedicação, apoio, motivação, inspiração, dado ao longo deste tempo. Em especial e com muito amor e carinho para os meus pais Amélia e Alcides e para o meu irmão Rui. Não me esquecendo também da minha mais recente família, da qual fazem parte os meus sogros Glória e Fernando, os meus sobrinhos Telma e Rodrigo e os meus cunhados Nadine, Cláudia e Paulo.

Para terminar e por ser a pessoa mais importante na minha vida queria agradecer de forma especial ao meu marido Bruno. Muito Obrigado...por toda a confiança, paciência, compreensão, ajuda, amor e muito apoio que me tens dado durante todos estes anos da minha vida.

palavras-chave

Hidroxiapatite; Grânulos; fármaco (5-Flourouracil); Biomateriais.

resumo

Os avanços recentes na área das Ciências Biomédicas exigem a necessidade de desenvolvimento de materiais que permitam a reconstrução óssea, facilitando o crescimento e regeneração dos tecidos. Tais materiais deverão apresentar a capacidade de libertarem fármacos localmente e de uma forma controlada. Os materiais fosfocálcicos, particularmente aqueles à base de hidroxiapatite (Hap), são dos mais importantes e adequados a este tipo de aplicações. Apresentam a vantagem de serem quimicamente semelhantes à parte inorgânica do tecido ósseo, o que lhes confere propriedades biológicas únicas, tais como excelente bioactividade e osteocondutividade. Possuem, além disso, a capacidade de adsorverem substâncias com interesse biológico, o que os torna aplicáveis como sistemas de libertação controlada de fármacos. No presente trabalho prepararam-se grânulos de Hap, por atomização de suspensões aquosas de partículas de hidroxiapatite com diferentes morfologias, precipitadas a partir de soluções de cálcio/citrato/fosfato. Os resultados mostraram que as diferentes características morfológicas das partículas precipitadas de Hap foram determinantes para a microestrutura dos grânulos atomizados e para a sua evolução durante o tratamento térmico. Mostrou-se ser possível preparar grânulos com diferentes fases cristalinas que possuem capacidades adsorptivas diferentes. Obtiveram-se deste modo materiais com diferentes áreas superficiais e com diferentes fases cristalinas, com potencialidades para serem estudados como suporte de fármacos. Estudou-se o comportamento dos grânulos porosos de Hap face à adsorção e à libertação do fármaco anticancerígeno 5-Flourouracil (5-FU). Os resultados dos estudos de adsorção revelaram que o modelo de Langmuir é o que melhor se ajusta aos valores experimentais obtidos. Conclui-se no entanto não existir um modelo de reacção único que descreva a cinética da adsorção do 5-FU pelos grânulos.

Com o objectivo de elucidar o papel dos grupos citrato presentes nos grânulos de Hap no processo de adsorção do fármaco efectuaram-se ensaios de adsorção de 5-FU em partículas de Hap comerciais, originais ou previamente tratadas com citratos. Os resultados indicam que a presença de citrato na superfície das partículas inibe a adsorção do fármaco.

Avaliou-se ainda a possibilidade de preparação de um suporte de fármaco por atomização de suspensões de nanopartículas de Hap em 5-FU. Os resultados revelaram que à temperatura de trabalho a molécula do fármaco se degrada, pelo que deverão ser exploradas condições de atomização diferentes, de modo a ultrapassar este problema. De referir, no entanto, que os resultados apontam a possibilidade de se usar o processo de atomização para preparar fluorapatite a partir de nanopartículas de Hap.

Os resultados dos estudos de liberação do fármaco pelos grânulos permitiram concluir que a taxa de liberação do fármaco em estudo pode ser controlada utilizando grânulos com diferentes características, nomeadamente área superficial/porosidade, composição de fases cristalinas e estado de superfície. Conclui-se também que os íões presentes no meio de liberação têm forte influência nos processos de liberação, afectando a sua velocidade. Os resultados obtidos sugerem a viabilidade da aplicação de grânulos porosos apatíticos como sistemas de liberação do fármaco 5-Fluorouracil.

keywords

Hydroxyapatite; Granules; Drug (5-Flourouracil); Biomaterials

abstract

In biomedical research there is a growing need in developing materials for bone substitution which will promote the regeneration and growth of the surrounding tissue. Such materials should be not only biocompatible, resorbable, but also bioactive. At the same time they should have the capability of releasing chemicals, drugs and growth factors at controlled kinetics. Advantages of implantable drug delivery systems can include high release efficiency, precise dose control, low toxicity and allow to overcome disadvantages connected with conventional methods.

Calcium phosphate-based materials, in particular hydroxyapatite-based ones are among the most important for biomedical applications. As they have similar chemical composition as human bone, they demonstrate excellent biocompatibility with hard tissues and reveal bioactive, osteoconductive properties. Besides, their capability of adsorbing biological active molecules makes them interesting materials to be used as carriers for drugs, growth factors and stem cells. Porous apatite particles, due to their microporous structure, can ensure a slow and controlled release of an incorporated drug.

In the present work, hydroxyapatite granules were produced by spray drying suspensions of particles with different morphologies, previously precipitated in calcium/citrate/phosphate solutions. It was observed that the morphology of the suspended particles was determining the spray dried granules morphology and microstructure. Besides, the heat treatment of the spray dried granules modifies not only the granules porosity but also its crystal phase composition. It was demonstrated the possibility of producing apatite granules with different phase composition and, as consequence, with different adsorption behaviour. Materials with different specific surface area and different phase composition with potentialities to be studied and used as drug carriers were thus synthesized.

The adsorption and release behaviour of porous apatite granules, which are intended to be used as 5-Flourouracil (5-FU) delivery systems and bone regeneration templates were also investigated in this work. Adsorption results may be described as Langmuir-type isotherms. Adsorption kinetics studies can be described by an intra-particle diffusion model only during a specific period of time. Besides, a pseudo second order diffusion model can be adjusted to the experimental results during all the adsorption period. FTIR spectrum of the porous apatite granules show not only the characteristic adsorption bands of HAp but also two stretching bands assigned to the carboxylic group (COO⁻) belonging to the citrate ion. In order to get more insight the role of those citrate species during the adsorption process of 5-FU, commercial Hap particles surface have been pretreated with citric acid. Results obtained for the adsorption of 5 FU in these conditions revealed that the adsorbed citrate groups condition the adsorption of the drug.

Another study also undertaken in this work was related with the obtention of a drug carrier by spray drying suspensions of Hap nanoparticles in 5-FU solution. The results showed that at the spray drying temperature the drug molecule suffer degradation. In order to overcome this problem, different spray drying conditions must be tried. Although, it must be pointed out the possibility of obtain fluorapatite by spray drying a suspension of Hap nanoparticles. Results of *in-vitro* release of 5-FU allow to conclude that the release rate can be controlled by using apatite granules with different characteristics as a drug carrier. Besides, it can also be concluded that the composition of the released medium has a great influence in the release process, affecting the release rate. These results suggest that the so produced porous apatite granules may serve as an effective tool for the local administration of the drug 5-Flourouracil.

Dedico este trabalho
ao meu marido Bruno
aos meus pais Amélia e Alcides
e ao meu irmão Rui,
pelo incansável apoio.

Índice

| | |
|--|------|
| Lista de Figuras..... | III |
| Lista de Tabelas..... | VIII |
| | |
| Capítulo 1- Introdução..... | 1 |
| Introdução e Objectivos | 3 |
| Revisão Bibliográfica | 5 |
| 1.1. Sistemas libertadores de fármacos | 5 |
| 1.2. Materiais cerâmicos fosfocálcicos | 7 |
| 1.2.1. Hidroxiapatite..... | 10 |
| 1.2.1.1. Estrutura cristalina da hidroxiapatite | 10 |
| 1.2.2. β -Fosfato tricálcico | 12 |
| 1.2.2.1. Estrutura cristalina do β -Fosfato tricálcico | 13 |
| 1.3. Métodos de preparação de materiais fosfocálcicos..... | 14 |
| 1.4. Adsorção..... | 17 |
| 1.4.1. Adsorção: Caracterização do equilíbrio..... | 19 |
| 1.4.1.1. Isotérmica de Langmuir | 20 |
| 1.4.1.2. Isotérmica de Freundlich..... | 22 |
| 1.4.1.3. Isotérmica de Dubinin-Radushkevich..... | 24 |
| 1.5. Adsorção: estudos cinéticos..... | 26 |
| 1.6. Fármaco 5-Fluorouracil | 28 |
| 1.7. Estudos de libertação por dispositivos cerâmicos fosfocálcicos | 31 |
| Capítulo 2- Procedimento experimental | 41 |
| 2. Procedimento experimental..... | 43 |
| 2.1. Preparação de grânulos de hidroxiapatite..... | 43 |
| 2.1.1. Precipitação de partículas de Hap | 44 |
| 2.1.2. Preparação de grânulos de Hap por atomização..... | 44 |
| 2.1.3. Tratamento térmico dos grânulos | 46 |
| 2.2. Carregamento dos grânulos de Hap com o fármaco 5-Flourouracil | 46 |
| 2.3. Libertação de 5-Flourouracil de partículas de Hap..... | 48 |
| 2.4. Caracterização dos materiais | 49 |

| | |
|--|-----|
| Capítulo 3 – Resultados e discussão | 51 |
| 3. Resultados e discussão..... | 53 |
| 3.1. Caracterização dos materiais utilizados como suporte de fármaco | 53 |
| 3.1.1. Características das partículas comerciais de Hap | 53 |
| 3.1.2. Características das partículas precipitadas | 56 |
| 3.2. Características dos grânulos obtidos por atomização | 59 |
| 3.3. Características dos grânulos tratados termicamente | 62 |
| 4. Adsorção de 5-Flourouracil por grânulos de Hap | 69 |
| 4.1. Estudos de Equilíbrio..... | 69 |
| 4.2. Estudos Cinéticos..... | 73 |
| 4.3. Influência dos grupos citratos na adsorção de 5-FU..... | 78 |
| 4.4. Mecanismos da adsorção do 5-FU nos grânulos | 83 |
| 4.4.1. Adsorção em grânulos tratados a 800°C..... | 87 |
| 4.5. Atomização de suspensões de nanopartículas de Hap em 5-Flourouracil | 89 |
| 5. Estudos de liberação do 5-Flourouracil | 94 |
| 5.1. Liberação do 5-FU dos grânulos Gra _{3:1} | 94 |
| 5.2. Características dos grânulos Gra _{3:1} após liberação..... | 97 |
| 5.3. Efeitos da composição do meio no processo de liberação do 5-FU | 99 |
| 5.4. Liberação do 5-FU por grânulos tratados termicamente a 800°C | 102 |
| Capítulo 4 – Conclusões Gerais..... | 107 |
| Capítulo 5 - Bibliografia..... | 111 |
| Anexo 1 | 127 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1- Perfil de libertação de um fármaco no plasma sanguíneo em função do tempo: (A) em processos resultantes por SLF e (B) convencionais de administração . Adaptado da ref [1] | 4 |
| Figura 2-Esquema representativo de uma libertação típica sinodal [6]..... | 5 |
| Figura 3- Isotérmicas de solubilidade em água de diferentes fosfatos de cálcio. A solubilidade é expressa pela quantidade total de iões cálcio na solução [12]..... | 9 |
| Figura 4- Ilustração de : (A) estrutura do cristal; (B) faces ac ou bc de hidroxiapatite; (C) organização dos iões OH ⁻ na estrutura da hidroxiapatite [2]..... | 12 |
| Figura 5- Esquema de uma estrutura modelo de β -TCP [28]..... | 13 |
| Figura 6- Esquema representativo do processo de adsorção de moléculas em sólidos porosos com macro e micro porosidade, adaptado da ref. [49]..... | 18 |
| Figura 7- Isotermica de adsorção..... | 19 |
| Figura 8-Estrutura química do 5-FU..... | 29 |
| Figura 9- Esquema representativo do transporte do fármaco 5-FU no corpo humano..... | 31 |
| Figura 10 – Fluxograma do procedimento experimental utilizado na preparação de partículas e de grânulos de hidroxiapatite..... | 43 |
| Figura 11- Fotografia do atomizador laboratorial utilizado..... | 45 |
| Figura 12- Ilustração esquemática do atomizador laboratorial Buchi-191..... | 45 |
| Figura 13- Difractograma de raios X das partículas comerciais..... | 53 |
| Figura 15- Espectro de FTIR das partículas comerciais..... | 54 |
| Figura 14- (a, b) Micrografias de SEM das partículas comerciais na forma original..... | 54 |
| Figura 16- Espectro de Raman das partículas comerciais..... | 55 |
| Figura 17- Difractograma de RX das partículas precipitadas a partir de soluções com razões citrato/cálcio 3:1 (a) e 5:1 (b)..... | 56 |
| Figura 18- a) Micrografia de TEM das partículas precipitadas Hap3:1; b) Diagrama de difracção de electrões das mesmas partículas..... | 57 |
| Figura 20- Espectro de FT-IR de a) partículas precipitadas com razão citrato/cálcio 3:1 e b) razão 5:1..... | 58 |
| Figura 19- Micrografias de SEM das partículas precipitadas em solução com razão citrato/cálcio 5:1..... | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 21- Micrografias de SEM dos grânulos obtidos por atomização de suspensões de partículas Hap3:1 (a e b); e de partículas Hap5:1 (c e d)..... | 59 |
| Figura 22- Análises granulométricas dos grânulos Gra3:1 (a) e Gra5:1 (b);..... | 60 |
| Figura 23- Difractograma de RX para as partículas Gra _{3:1} (a) e Gra _{5:1} (b)..... | 61 |
| Figura 24- Difrakção de electrões das partículas Gra3:1..... | 61 |
| Figura 25- Espectros de FTIR dos grânulos Gra3:1 (a) e Gra5:1 (b)..... | 62 |
| Figura 26- Micrografias de SEM dos grânulos Gra3:1 e Gra5:1: antes do tratamento térmico (a, b); tratados a 600°C (c, d) e tratados a 800°C (e, f)..... | 63 |
| Figura 27- Variação da área superficial específica dos grânulos Gra3:1 (▲) e Gra5:1 (□) tratadas termicamente a diferentes temperaturas..... | 64 |
| Figura 28- ATD/ATG dos grânulos porosos Gra _{5:1} | 64 |
| Figura 29- Espectro de FTIR dos grânulos Gra5:1 (a); calcinados a 200°C (b); 400°C (c); 600°C (d) e 800°C (e)..... | 65 |
| Figura 30-Difrakção de RX dos grânulos Gra5:1 (a); calcinados a 200°C (b); a 400°C (c); a 600°C (d) e a 800°C (e)..... | 66 |
| Figura 31- Micrografia de TEM das partículas Gra3:1 ₈₀₀ com tempo de 0 segundos de exposição ao feixe (a, b) e tempo de exposição ao feixe de 15 segundos (c)..... | 67 |
| Figura 32- Difrakção de electrões obtido por TEM para duas estruturas cristalográficas a) hidroxiapatite; b) β-TCP..... | 68 |
| Figura 33— Isotérmicas de adsorção do 5-FU por grânulos Gra3:1 (●) resultados experimentais; (-□-) isotérmica de Langmuir; (-◇-) isotérmica de Dubinin-Radushkevich; (-Δ-) isotérmica de Freundlich | 69 |
| Figura 34- Esquema ilustrativo do estado de superfície dos grânulos antes do início do processo de adsorção do 5-FU..... | 72 |
| Figura 35- Espectros de FTIR dos grânulos Gra3:1 (a); e após 0,5 dias de adsorção (b); 1 dia de adsorção (c); 3 dias de adsorção (d) e 7 dias de adsorção de 5-FU (e);..... | 72 |
| Figura 36-Adsorção de 5-FU por grânulos de HAP em soluções de 5-FU com concentrações de 0,25; 0,5; 1,5; 5 e 10 g/L..... | 73 |
| Figura 37- Comparação entre a evolução experimental da quantidade de fármaco adsorvida (▲, ◇, ■, ○, □) e a evolução prevista pela cinética de pseudo primeira ordem (), para as diferentes concentrações de 5-FU na solução..... | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 38- Comparação entre a evolução experimental da quantidade de fármaco adsorvida (▲, ◇, ■, ○, □) e a evolução prevista pela cinética de pseudo segunda ordem (___), para as diferentes concentrações de 5-FU na solução..... | 75 |
| Figura 39- Modelação de adsorção do 5-FU pelos grânulos, usando a cinética de difusão intrapartícula, para diferentes concentrações do fármaco em solução. Cinética de reacção de adsorção de difusão intrapartícula do 5-FU em grânulos a diferentes concentrações iniciais..... | 76 |
| Figura 40- Comparação entre os valores experimentais e os modelos cinéticos em função do tempo para a concentração de 5-FU de 5g/L..... | 77 |
| Figura 41-Comparação dos difractogramas (DRX) correspondentes às partículas comerciais (tal recebidas) e aos grânulos Gra3:1..... | 78 |
| Figura 42-Imagem de SEM das partículas de HAP: (a) grânulos porosos e (b) partículas comerciais (tal qual recebidas)..... | 79 |
| Figura 43-Espectros de FTIR de partículas de hidroxiapatite: (a) partículas comerciais originais, (b) partículas comerciais submetidas a tratamento com solução de citratos e (c) grânulos Gra3:1 de Hap..... | 79 |
| Figura 44- Esquema representativo das configurações monodentada (A) e bidentada (B) do ião citrato adsorvido, adaptado da ref. [58]..... | 80 |
| Figura 45-Dependência do potencial zeta relativamente ao pH para as diferentes partículas de Hap: (-◇-) partículas comerciais Hap originais, (-■-) partículas comerciais com iões citrato adsorvidos e (-▲-) grânulos Gra3:1..... | 80 |
| Figura 46-Variação da quantidade adsorvida de 5-FU com o tempo de carregamento para (-▲-) grânulos Hap, (-◇-) partículas comerciais com iões citratos pré-adsorvidos e (-■-) partículas comerciais originais..... | 81 |
| Figura 47- Estrutura molecular do 5-FU..... | 82 |
| Figura 48- Variação do valor de pH com o tempo de adsorção de 5-FU pelos grânulos Gra3:1..... | 83 |
| Figura 49- Medidas de mobilidade electroforética para a adsorção de 5-FU (5g/L) por grânulos Gra3:1..... | 84 |
| Figura 50- Esquema representativo do processo de adsorção do 5-FU por grânulos porosos de hidroxiapatite..... | 85 |

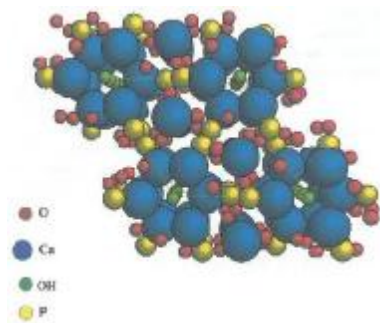
| | |
|--|-----|
| Figura 51- Variação da quantidade de 5-FU adsorvido por grânulos Gra3:1 em função do tempo de imersão á temperatura de 25°C para a concentração de 5-FU de 250mg/L (-Δ-) solução tampão de fosfatos pH 5.6 e (-◇-) solução de fosfatos a pH 7.4..... | 86 |
| Figura 52- Variação da quantidade de 5-FU adsorvida com o tempo de imersão para (-□-) grânulos Gra3:1 e (-Δ-) para grânulos Gra3:1 ₈₀₀ tratados termicamente a 800°C..... | 87 |
| Figura 53- Micrografias de SEM dos grânulos Gra3:1 após adsorção..... | 88 |
| Figura 54- Micrografias de SEM dos grânulos (Gra3:1) tratados termicamente a 800°C após a adsorção de 5-FU..... | 88 |
| Figura 55- Difractograma de raios X correspondente (a) ao 5-FU e (b) ás partículas atomizadas com 5-FU;..... | 90 |
| Figura 56-(a) Espectro de FTIR completo das partículas após o processo de atomização; (b) ampliação do espectro de FTIR para número de onda entre 400 e 1600 cm ⁻¹ | 91 |
| Figura 57- Imagens de SEM das partículas Hap3:1 atomizadas com 5-FU. A imagem (c) corresponde a uma amplificação da zona assinalada em (a)..... | 92 |
| Figura 58- ATD/ATG do composto 5-FU..... | 93 |
| Figura 59- a) Variação da quantidade de 5-FU libertada por grânulos com o tempo de libertação para diferentes concentrações iniciais de fármaco na solução de carregamento: (-◇-) 0,5g/L; (-■-) 1,5 g/L; (-▲-) 5g/L; (-×-) 10g/L; (b) velocidade de libertação do fármaco 5-FU por grânulos em função do tempo de imersão..... | 94 |
| Figura 60- Variação da concentração do cálcio (a) e do fósforo (b) na solução de libertação, durante os primeiros sete dias de libertação do 5-FU..... | 95 |
| Figura 61- Variação do potencial zeta com o pH para os grânulos após: 7dias de adsorção (-◇-) e após diferentes períodos de libertação: (-■-) doze horas; (-▲-) um dia; (-●-) três dias e (-□-) sete dias;..... | 97 |
| Figura 62- Difracção de RX dos grânulos após o carregamento do fármaco e após diferentes dias na solução de libertação do 5-FU..... | 98 |
| Figura 63- Imagens de SEM dos grânulos após: (a) meio-dia de libertação e (b) 7 dias..... | 98 |
| Figura 64- Variação da percentagem de fármaco 5-FU libertado de grânulos com o tempo de imersão para (-□-) uma solução de força iónica 0M e (-◇-) uma solução de força iónica de 0,145M..... | 99 |
| Figura 65- Curva derivada da percentagem de libertação do 5-FU com o tempo de imersão para (a) força iónica 0.145M e para (b) para força iónica de 0M..... | 100 |

| | |
|---|-----|
| Figura 66- Difrração de RX dos granulos após libertação numa solução tampão de fosfatos de: (a) força iónica 0,145M e (b) força iónica 0M..... | 102 |
| Figura 67- Variação da percentagem de fármaco libertado em função do tempo de libertação para: (-◇-) grânulos e (-□-) grânulos tratados termicamente a 800°C..... | 103 |
| Figura 68- Variação da velocidade de libertação do fármaco com o tempo de libertação para: (a) grânulos e (b) grânulos tratados termicamente a 800°C..... | 103 |
| Figura 69- Difrração de RX dos grânulos: (a) antes do processo de libertação, (b) após o processo de libertação numa solução tampão de fosfatos..... | 104 |
| Figura 70- Difrração de RX dos granulos tratados termicamente a 800°C: (a) antes do processo de libertação; (b) após o processo de libertação numa solução de fosfatos..... | 105 |
| Figura 71- (a) Grânulos Gra3:1 após 7 dias de libertação tal qual preparados e (b) grânulos tratados termicamente a 800°C..... | 105 |
| Figura 72- Representação 3D da molecula 5-FU obtida pelo programa CS chem3D Pro..... | 127 |
| Figura 73- Página do programa com o esquema de obtenção da energia mínima para uma dada molécula..... | 127 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Características de alguns fosfatos de cálcio* [14]..... | 8 |
| Tabela 2- Parâmetros cristalográficos da hidroxiapatite e do β - fosfato tricálcico [23]..... | 14 |
| Tabela 3- Condições experimentais de precipitação e características das partículas de Hap obtidas..... | 56 |
| Tabela 4- Constantes de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich..... | 71 |
| Tabela 5- Comparação de alguns parâmetros referentes aos modelos de pseudo primeira ordem, pseudo segunda ordem e difusão intrapartícula: coeficiente de correlação (r^2), constantes cinéticas (K_1 , K_2 e K_p) e quantidade de fármaco adsorvida ao fim do tempo de equilíbrio (q_e, cal)..... | 75 |

Capítulo 1- Introdução



“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original...”

Albert Einstein

Introdução e Objectivos

A maior parte dos fármacos hoje disponíveis no mercado são administrados por via oral. Com efeito, a facilidade das tomas, a menor dependência de terceiros para a manutenção da terapêutica e os menores custos de produção que estes apresentam, justificam a opção crescente tanto dos utentes como da Indústria Farmacêutica. No entanto, parece ser consensual que a administração das formas orais ditas convencionais (comprimidos, cápsulas) poderá levar a uma libertação pouco específica dos respectivos princípios activos, a qual depende de numerosos factores fisiológicos. Tal facto tem contribuído para o interesse crescente da comunidade científica no desenvolvimento de sistemas que permitam a libertação selectiva e localizada de fármacos, possibilitando assim o aumento da eficiência do tratamento e a diminuição dos efeitos adversos associados aos sistemas convencionais de administração.

Torna-se pois evidente a necessidade de recorrer ao uso de sistemas de libertação controlada de fármacos para tentar conjugar as formas orais de administração com o perfil farmacocinético adequado a cada caso específico. Basicamente pretende-se modificar ou melhorar as características de libertação dos sistemas activos, de modo a permitir o aumento da acção dos fármacos e a redução da frequência de administração. As formulações destinadas à obtenção de sistemas de libertação controlada devem permitir modificar a configuração dos perfis de libertação, eliminando os consecutivos máximos e mínimos verificados nos métodos tradicionais de administração, contribuindo deste modo para a manutenção na corrente sanguínea de uma concentração estável do sistema activo

Figura 1 [1].

O primeiro sistema libertador de fármaco (SLF) foi desenvolvido em meados dos anos trinta, tendo como objectivo aumentar o nível de um fármaco no sangue. No entanto só nos anos 70 é que os sistemas libertadores começaram a ser desenvolvidos com objectivos comerciais, embora com configurações muito primárias[2, 3].

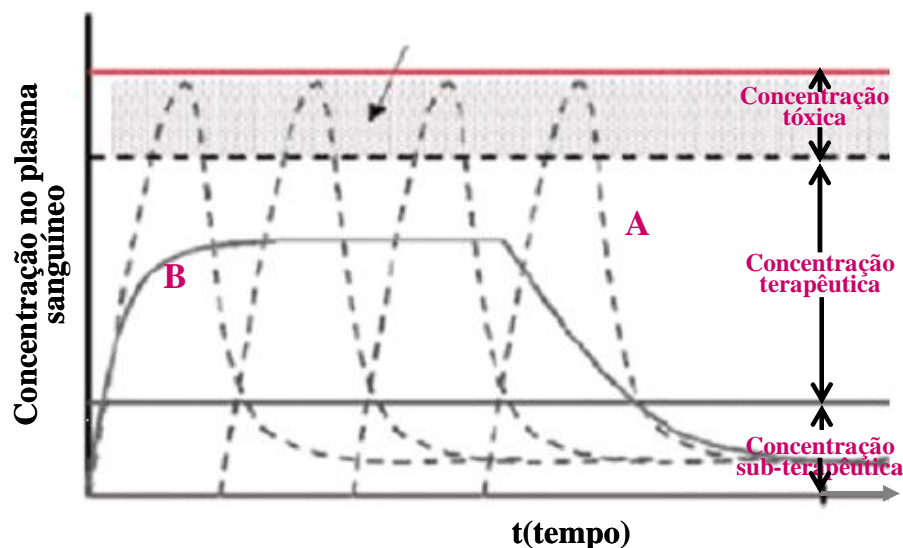


Figura 1- Perfil de liberação de um fármaco no plasma sanguíneo em função do tempo: (A) em processos resultantes por SLF e (B) convencionais de administração . Adaptado da ref [1] .

Entre os modernos SLF destacam-se alguns materiais biocerâmicos fosfocálcicos devido às suas propriedades de biocompatibilidade, osteocondutividade, e biodegradabilidade que, ao papel de veículo do fármaco, podem acrescentar valências muito interessantes como a de funcionar como suporte de crescimento de células e de facilitar a regeneração do osso. Estudos recentes evidenciaram a capacidade adsorptiva de alguns materiais fosfocálcicos porosos face a uma droga modelo, apontando-os como potenciais candidatos para futuras aplicações como SLF. O aprofundamento do conhecimento sobre o comportamento adsorptivo e de liberação do fármaco alvo por parte dessa classe de materiais é no entanto fundamental para se desenhar e projectar o SLF pretendido.

O presente trabalho tem como objectivo geral o estudo do comportamento de grânulos porosos de hidroxiapatite face à adsorção e à liberação do fármaco anticancerígeno 5-Fluorouracil. Pretende-se caracterizar o processo dinâmico de adsorção do fármaco bem como os aspectos mais relevantes da sua liberação *in vitro*, tentando identificar parâmetros determinantes para a funcionalidade do SLF.

Revisão Bibliográfica

1.1.Sistemas libertadores de fármacos

Um sistema de libertação controlado de fármaco deve permitir um controlo tanto espacial como temporal do agente activo libertado, induzindo a reacção química desejada no paciente e melhorando o seu estado de saúde [4, 5]. Grande parte dos sistemas libertadores de fármacos desenvolvidos apresentam comportamentos semelhantes, ou seja inicialmente é libertada uma quantidade apreciável de fármaco seguindo-se a desaceleração da taxa de libertação até se atingir um nível estável, que se irá manter durante um período de tempo mais ou menos longo. Este comportamento é tipicamente representado por uma curva de libertação sinodal, Figura 2 [6].

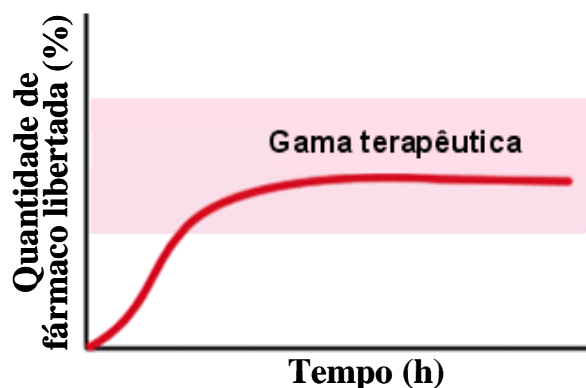


Figura 2-Esquema representativo de uma libertação típica sinodal [6]

Actualmente, os libertadores controlados de fármacos podem ser classificados segundo dois critérios distintos: um refere-se à configuração final do suporte utilizado como SLF e o outro ao modo como podem ser administrados os SLF no corpo humano. As configurações finais existentes de um SLF podem ser agrupadas em sete grandes categorias, tais como: cápsulas, membranas, nanoesferas, microsferas, materiais porosos, hidro-géis e materiais receptivos, podendo as diversas configurações ser produzidas por materiais de variada natureza. No que refere ao modo de administração são conhecidas cinco formas diferentes, sendo elas: a administração por injeção, por inalação, oralmente, por implantação e na forma transdermal.

Os SLF podem ainda permitir a libertação de substâncias activas (químicas ou biológicas) que podem ser muito úteis no tratamento da doença em causa. A estas vantagens acresce o facto de possibilitarem uma libertação local do fármaco a uma taxa controlada, aumentando a eficácia do tratamento e exigindo quantidades inferiores de fármaco. A formulação destes sistemas veio, por outro lado, possibilitar a administração de uma dosagem controlada de fármacos durante longos períodos de tempo, que se podem prolongar nalguns casos até aos cinco anos [7, 8].

Contudo dado que estes novos sistemas de libertação são muito dispendiosos a razão custo/benefício é muito elevada comparativamente com os métodos tradicionais de administração de fármacos [8].

Genericamente no desenvolvimento de um libertador controlado de fármacos, devem ser tomadas em consideração determinadas características por forma a permitir um melhor desempenho e uma maior eficácia no tratamento de doenças. Os principais requisitos que se exigem de um SLF são os seguintes [7, 8]:

- i) Biocompatibilidade de forma a não ser tóxico, antigénico, carcinogénico, inflamatório e trombogénico;
- ii) A taxa de degradação do suporte *in vivo* deve ser previsível;
- iii) Os produtos resultantes da degradação devem ser facilmente excretados do organismo;
- iv) Após implantação, deve apresentar um comportamento análogo ao dos tecidos circundantes;
- v) O perfil de libertação do fármaco deve ser preciso e correcto;
- vi) Deve existir estabilidade do fármaco no sistema libertador;
- vii) Deve ser esterilizável [9];

A microestrutura do material de suporte, em particular a sua porosidade, tamanho e distribuição de poros, bem como a existência de um certo grau de interconectividade influenciam o comportamento de libertação do fármaco [10]. A existência de poros de tamanho submicrométrico favorece a aplicação como sistemas de libertação controlada, uma vez que contribui para uma interacção mais forte das moléculas do fármaco com as paredes dos poros, assegurando tempos de libertação maiores.

Para uma melhor compreensão da preparação, propriedades e funcionalidade dos dispositivos fosfocálcicos utilizados como SLF, apresenta-se seguidamente uma revisão de

assuntos estruturada da seguinte forma: primeiramente abordam-se as propriedades e métodos de preparação de materiais fosfocálcicos. Seguidamente apresentam-se modelos correntemente utilizados para o estudo e caracterização da dinâmica dos fenómenos de adsorção e do seu estado de equilíbrio. A completar esta revisão apresentar-se-ão alguns estudos que documentam o comportamento de libertação de fármaco de alguns SLF reportados na literatura.

1.2. Materiais cerâmicos fosfocálcicos

No presente capítulo apresenta-se a revisão de aspectos relacionados com a preparação e propriedades de suportes para libertação de fármacos. Atendendo aos objectivos definidos para o presente trabalho, esta revisão de assuntos focará fundamentalmente os suportes fosfocálcicos.

A maioria dos materiais fosfocálcicos usados experimentalmente *in vivo* são ortofosfatos de cálcio (Ca-P), isto é materiais que contêm o grupo ortofosfato PO_4^{3-} . Existem duas categorias diferentes de Ca-P identificadas como: (1) Ca-P de baixas temperatura, obtidos por precipitação a partir de soluções aquosas e/ou próximo da temperatura ambiente, e (2) Ca-P de alta temperatura obtidos por reacções a temperaturas elevadas [11]. A maior parte dos produtos de Ca-P comerciais existentes no mercado pertencem a esta segunda categoria.

Na tabela 1 apresentam-se os fosfatos de cálcio mais utilizados em aplicações médicas e algumas das suas características, nomeadamente produtos de solubilidade (a 25 e a 37°C), a razão Ca/P e o pH de estabilização em soluções aquosas a 25°C.

Devido ao facto de possuírem características químicas e morfológicas muito similares às do osso natural e aos parâmetros da sua resposta biológica, nomeadamente a biodegradação, os materiais fosfocálcicos são muito importantes em aplicações clínicas [12]. De todos os fosfatos de cálcio apresentados na tabela 1, apenas dois são estáveis em contacto com os fluidos humanos e á temperatura do corpo humano (37°C): se o pH dos fluidos humanos for inferior a 4.2 a fase que se mantém estável é o fosfato dicálcio ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, brushite, C_2P), ao passo que para valores de pH superiores a fase estável presente é a hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$, Hap) [13]. Assim, a solubilidade dos Ca-Ps em meio fisiológico é muito importante: quando esse valor for menor do que o

correspondente à parte mineral do osso, degradar-se-á a uma velocidade muito lenta; se, pelo contrário, a solubilidade dos Ca-P for maior do que a parte mineral do osso, o material degrada-se rapidamente [14].

Tabela 1- Características de alguns fosfatos de cálcio* [14]

| Razão Ca/P | Composto | Formula | Solubilidade a 25°C, -log (K _{ps}) | Solubilidade a 37°C, -log(K _{ps}) | pH de estabilização em soluções aquosas a 25°C |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|--|---|--|
| CaP precipitados | | | | | |
| 0.5 | Fosfato monocálcio monohidratado | Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O | 1.14 | - | 0.0-2.0 |
| 1.5-1.67 | Hidroxiapatite deficiente em cálcio | Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-2x} (0<X<1) | ~85.1 | ~85.1 | 6.5-9.5 |
| 1.2-2.2 | Fosfato de cálcio amorfo | Ca _x (PO ₄) ₂ ·nH ₂ O | [c] | [c] | [c] |
| 1.0 | Fosfato dicálcio dihidratado | CaHPO ₄ ·2H ₂ O | 6.59 | 6.63 | 2.0-6.0 |
| 1.0 | Fosfato dicálcio não hidratado | CaHPO ₄ | 6.90 | 7.02 | [d] |
| 1.33 | Fosfato octacálcio | Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O | 96.6 | 95.9 | 5.5-7.0 |
| CaP altas temperaturas | | | | | |
| 1.5 | α-Fosfato tricálcico | α -Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 25.5 | 25.5 | [b] |
| 1.5 | β-Fosfato tricálcico | β -Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 28.9 | 29.5 | [b] |
| 0.5 | Fosfato monocálcio não hidratado | Ca(H ₂ PO ₄) ₂ | 1.14 | - | [d] |
| 1.67 | Hidroxiapatite | Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ | 116.8 | 117.2 | 9.5-12 |
| 2.0 | Fosfato tetracálcio | Ca ₄ (PO ₄) ₂ ^o | 38-44 | 37-42 | [b] |

[b]- Este composto não pode ser precipitado a partir de soluções aquosas. [c]- não pode ser medido com precisão. [d]- estável apenas a temperaturas superiores a 100°C. [e]- Encontra-se sempre na forma metastável. *adaptação da ref. [14]

Um outro aspecto relevante é a solubilidade do osso no seu ambiente biológico. Os estudos realizados mostraram que a solubilidade da parte mineral do osso está muitas vezes relacionada com a concentração de iões que integram o fluido extracelular tais como: Ca²⁺; PO₄³⁻, e CO₃²⁻. Para além disso a solubilidade é afectada pelos processos de reabsorção pelos osteoblastos. Estas células têm a particularidade de produzir grandes quantidades de ácido quando contactam com a superfície do osso e, como consequência, de induzir a dissolução mineral do osso [12].

O diagrama das isotérmicas de solubilidade de diferentes fosfatos de cálcio em solução aquosa é apresentado na Figura 3.

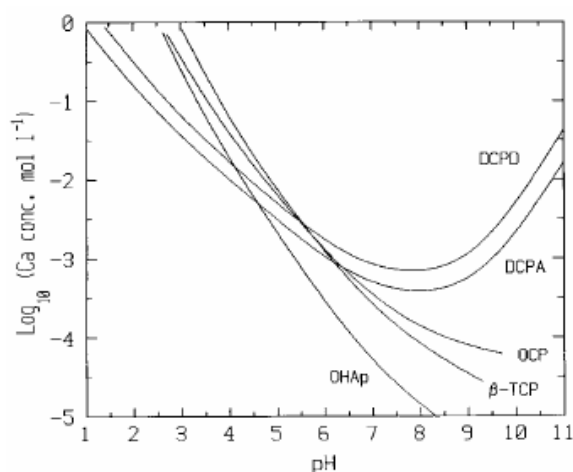
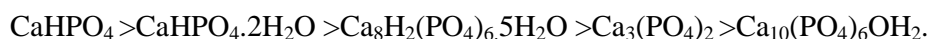


Figura 3- Isotérmicas de solubilidade em água de diferentes fosfatos de cálcio. A solubilidade é expressa pela quantidade total de iões cálcio na solução [12]

De uma forma genérica os cerâmicos fosfocálcicos degradam-se *in vivo* segundo a seguinte ordem [11, 15, 16]:



Entre os vários tipos de cerâmicos fosfocálcicos, merecem particular atenção a hidroxiapatite (Hap) e o β -tricálcio fosfato (β -TCP) devido a certos aspectos da sua resposta biológica em ambientes fisiológicos, nomeadamente o facto de possuírem a capacidade de estimular a proliferação das células [17], e pela razão de serem os materiais mais usados em medicina [15]. A Hap e o β -TCP são os materiais fosfocálcicos que apresentam menor solubilidade (Figura 3). Destaca-se o material cerâmico β -TCP por ser um material bioreabsorvível ao final de 1 a 2 anos, por ter a capacidade de induzir a formação de osso a partir do contacto com o colagéneo e posterior acumulação de células e proteínas na superfície, seguido de um processo de reabsorção dos iões presentes no fluido humano [17] e por ter muito sucesso em praticas clínicas, como por exemplo em tratamentos de desvios naturais da espinha dorsal, ou na união de aberturas existentes na coluna vertebral [15]. Quanto à hidroxiapatite, tem sido exaustivamente estudada por ser o material fosfocálcico mais estável em soluções aquosas e também por ser considerada como o material mais biocompatível [11]. Para além das particularidades interessantes que a Hap e o β -TCP apresentam separadamente, diversos estudos realizados mostraram que a combinação dos dois materiais num só dando origem a um composto bifásico de fosfato

de cálcio (BFC) tornou-se mais aprazível para determinadas aplicações, por apresentar propriedades melhoradas comparativamente às dos materiais Hap e β -TCP isolados [17].

1.2.1. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (Hap, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é um dos fosfatos de cálcio que se encontra presente em maior percentagem na componente mineral inorgânica do tecido ósseo [18]. Essa fase inorgânica pode incluir pequenas quantidades de outros compostos de cálcio, nomeadamente o carbonato de cálcio, o fluoreto de cálcio, o hidróxido de cálcio e o citrato de cálcio. A hidroxiapatite natural existente no osso humano é predominantemente cristalina, embora possa existir na fase amorfa. Provou-se cientificamente que a hidroxiapatite sintetizada em laboratório é compatível com o tecido biológico [17]. As suas propriedades físicas e químicas foram exaustivamente estudadas e os resultados obtidos mostraram que o seu comportamento *in vivo* é muito semelhante ao comportamento da hidroxiapatite biológica [18]. Além disso, outros estudos revelaram que a hidroxiapatite laboratorial possui bioactividade e biocompatibilidade superiores a outros materiais fosfocálcicos existentes [19]. No entanto o uso clínico da Hap apresenta algumas limitações devido à sua lenta biodegradação. Estudos realizados *in vivo* durante longos períodos de tempo demonstraram que a hidroxiapatite só começa a ser reabsorvida decorridos 4 ou 5 anos após o implante [15]. A velocidade de reabsorção é uma característica importante para a aplicação de materiais como implantes, pois o processo de degradação do implante é concomitante com a formação do novo tecido.

1.2.1.1. Estrutura cristalina da hidroxiapatite

O conhecimento da estrutura cristalina da Hap continua a ter um papel importante no entendimento da aplicabilidade deste material. Por exemplo, a morfologia dos cristais pode ser definida pelos estados de energia existentes na superfície das faces dos cristais [20], estados de energia esses que não podem ser discutidos sem o conhecimento da estrutura cristalina [20]. Além disso, é possível correlacionar a estrutura cristalina com os fenómenos que ocorrem na superfície, em particular com a capacidade da hidroxiapatite adsorver iões ou moléculas [20]. A hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) possui uma dimensão

de célula unitária de $a=b=0,94182$ nm e $c=0,68814$ nm, pertence ao grupo espacial $P6_3/m$ (176) e apresenta uma difracção máxima de raios-X no plano (211) [21-23]. Foram identificadas como fases cristalinas da hidroxiapatite a hexagonal e a monoclinica [24]. Basicamente a célula unitária da estrutura monoclinica é obtida a partir da hexagonal, isto é, devido a alterações das condições experimentais de preparação (pressão e temperatura) ocorre a duplicação do parâmetro de rede b , bem como um arranjo alternado da cadeia de aniões [24]. Normalmente à estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatite está associada a não estequiometria, enquanto que a estrutura monoclinica é normalmente estequiométrica [24]. No entanto não é simples preparar hidroxiapatite estequiométrica devido à grande facilidade de ocorrência de substituições atómicas [24]. Uma hidroxiapatite estequiométrica é caracterizada por uma razão de Ca/P de 10:6 e uma densidade de $3,219$ g/cm³ [21, 22]. Genericamente a célula unitária hexagonal da hidroxiapatite possui 10 iões cálcio localizados em sítios não equivalentes, 4 em sítios I (Ca_I) e 6 em sítios II (Ca_{II}). Os iões cálcio dos sítios I encontram-se alinhados em colunas, enquanto que os iões cálcio dos sítios II se localizam nos vértices de triângulos equiláteros perpendiculares à direcção c da estrutura. Os catiões Ca_I encontram-se coordenados a 6 átomos de oxigénio pertencentes a diferentes tetraedros de grupos PO_4 e também combinados a três outros átomos de oxigénio que se encontram relativamente distantes. O facto da estrutura da hidroxiapatite apresentar dois sítios catiónicos tem consequências importantes no que refere á aceitação de impurezas catiónicas, impurezas que podem ser decisivas para as propriedades e características finais. Os átomos de cálcio e fósforo presentes na estrutura da hidroxiapatite formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de alta simetria. A estrutura é composta por colunas constituídas por triângulos equiláteros de iões (O^{2-}) e de iões cálcio (Ca^{2+}) empilhados, ligadas entre si por iões fosfato. Dos quatro átomos de oxigénio que constituem os grupos fosfatos, dois situam-se em planos perpendiculares à direcção c e os outros dois em planos paralelos a essa direcção. Os tetraedros dos grupos PO_4 encontram-se dispostos de tal forma que possibilitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. Um dos canais tem o diâmetro de 2 \AA e é ocupado por átomos de (Ca_I). O outro canal possui um diâmetro de $3,5 \text{ \AA}$ e é constituído por iões (Ca_{II}). É no interior desses canais que ocorrem as distorções na estrutura cristalina que permitem distinguir a forma hexagonal da monoclinica [2, 25]. Uma representação esquemática da estrutura da célula unitária da hidroxiapatite é apresentada na Figura 4.

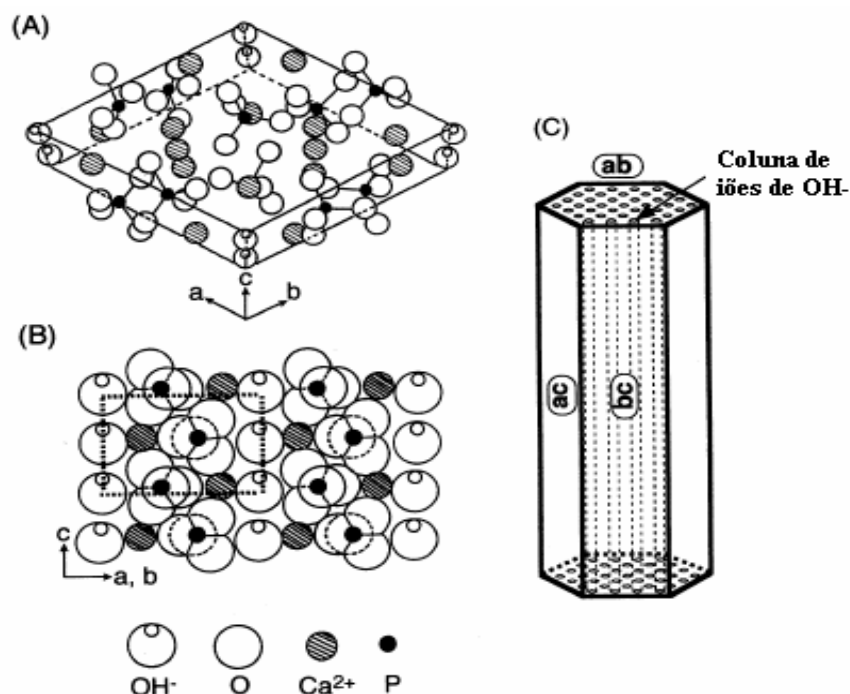


Figura 4- Ilustração de : (A) estrutura do cristal; (B) faces ac ou bc de hidroxiapatite; (C) organização dos íons OH⁻ na estrutura da hidroxiapatite [2]

1.2.2. β-Fosfato tricálcico

A elevada taxa de reabsorção do β-fosfato tricálcico *in vivo*, comparativamente à de outros materiais fosfocálcicos, constitui uma vantagem [26]. A obtenção do β-TCP não é possível por processos de precipitação directa, mas sim por tratamento térmico de outros fosfatos de cálcio. O β-TCP é um material estável à temperatura ambiente, e é menos solúvel em água do que o fosfato tricálcico α. Porém, em ambientes fisiológicos a calcificação biológica deste composto não ocorre. No entanto o corpo humano possui a capacidade de formar um composto semelhante, a “whitlockite” (Ca,Mg)₃(PO₄)₂, cuja composição é muito idêntica à do β-TCP (com algumas substituições na estrutura cristalina de íons cálcio por íons magnésio), que pode ser encontrado na pedra dos dentes, na carie dentária e nas cartilagens com artrites [11, 15, 16].

1.2.2.1. Estrutura cristalina do β -Fosfato tricálcico

A estrutura cristalina do β -tricálcico fosfato (β -TCP) apresenta simetria romboédrica com grupo espacial $R3c$ e célula unitária com as seguintes dimensões: $a=b=10.4331\text{\AA}$ e $c=37.375(6)\text{\AA}$ [27]. A estrutura é semelhante á do $\text{Ba}_3(\text{VO}_4)_2$ embora com uma ligeira distorção. Para além disso a estrutura do $\text{Ba}_3(\text{VO}_4)_2$ possui menos unidades do que a célula hexagonal unitária do β -TCP [27, 28]. Devido á semelhança das estruturas cristalinas, descreve-se e compara-se a estrutura do $\text{Ba}_3(\text{VO}_4)_2$ com a do β -TCP. A estrutura cristalina do $\text{Ba}_3(\text{VO}_4)_2$ é descrita por camadas de grupos VO_4 ligadas a dois tipos diferentes de átomos Ba. Um dos átomos de Ba está na coordenação 12 com a camada, e o outro na coordenação 10 entre a camada dando origem a uma coluna de $(\text{VO}_4\ldots\text{Ba}(1)\ldots\text{VO}_4\ldots\text{Ba}(2))$. Tal como a estrutura do $\text{Ba}_3(\text{VO}_4)_2$, a estrutura de β -TCP possui uma coluna A constituída por $(\text{P}(1)\text{O}_4\ldots\text{Ca}4\ldots\text{Ca}5\ldots\text{P}(1)\text{O}_4)$ e uma coluna B de $(\text{P}(1)\text{O}_4\ldots\text{Ca}4\ldots\text{Ca}(5)\ldots\text{P}(1)\text{O}_4)$ que surge de forma repetitiva na estrutura, figurando ambas as colunas A e B paralelas ao eixo C [27, 28]. A estrutura modelo do β -TCP ao longo do eixo (1-10) é ilustrada na Figura 5 [26]. Na tabela 2 apresentam-se de forma resumida os parâmetros cristalográficos mais importantes dos dois fosfatos de cálcio considerados.

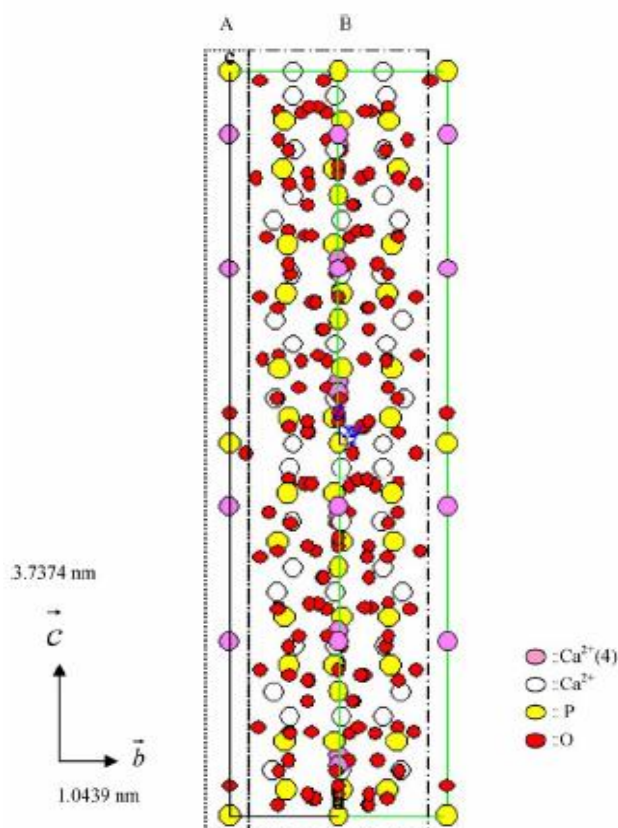


Figura 5- Esquema de uma estrutura modelo de β -TCP [28]

Tabela 2- Parâmetros cristalográficos da hidroxiapatite e do β - fosfato tricálcico [23].

| Compostos | Simetria | Parâmetros de Rede (Å) |
|---|--------------------------------------|---|
| Hidroxiapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ | Hexagonal ($\text{P6}_3/\text{m}$) | $a=b= 9,4182(5)$; $c=6,8814(4)$; $y= 120$ |
| B- Fosfato tricalcio $[\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ | Rhombohedral (R3c) | $A= 10,4331(4)$; $c= 37,375(6)$; $y= 120$ |

1.3.Métodos de preparação de materiais fosfocálcicos

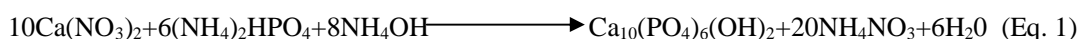
Têm sido propostos vários processos de preparação para a hidroxiapatite, verificando-se uma influência marcante do tipo de método de preparação nas propriedades finais do material obtido. Entre estas, a estequiometria, a estrutura cristalina e a porosidade são as mais determinantes para o comportamento biológico de tais materiais [14]. Os processos de síntese de materiais fosfocálcicos têm sido amplamente reportados na literatura compreendendo, para além do método convencional (reações em estado sólido), os seguintes métodos: a precipitação em soluções aquosas [29, 30] a técnica de *spray* ultrasónico acoplado com “*freeze-drying*” [31], os métodos hidrotérmicos [14], os processos de precipitação na presença de um agente gelatinoso [32] e mais recentemente a micro emulsão [33, 34], a electrocristalização [35], a “*spray-pirolise*” e a radiação de microondas [14].

Dos processos de síntese de materiais fosfocálcicos apresentados, a técnica de *freeze drying* possui a vantagem de conduzir a um pó com homogeneidade á escala molecular e com aglomeração mínima, características estas resultantes do arrefecimento rápido do material a baixas temperaturas e da sublimação do gelo em determinadas condições de vácuo [31].

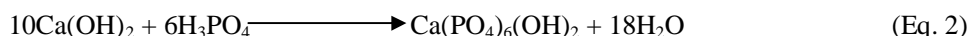
A técnica de micro emulsão parece ser uma metodologia de síntese muito promissora, pois permite a obtenção de nanomateriais com morfologias variadas, tais como: cones, agulhas, esferas, tubos e fios, a partir do ajuste da razão água/ solvente orgânico [34].

Alguns autores têm recorrido à técnica de precipitação de partículas em presença de agentes gelatinosos, com o principal objectivo de inibir o crescimento das partículas, conseguindo desta forma produzir materiais fosfocálcicos com dimensões nanométricas. No entanto esta técnica tem desvantagens relativamente a outras já apresentadas, pois as nanopartículas obtidas por este processo não se apresentam individualizadas, mas sim fortemente aglomeradas [32].

A precipitação em soluções aquosas é uma das técnicas mais utilizadas que viabiliza a utilização de diversas combinações de reagentes sendo, as mais comuns a do hidrogénio di-amónio de fosfato com o nitrato de cálcio e a do ácido ortofosfórico com o hidróxido de cálcio. A primeira combinação requer o uso de solução aquosa de amónia para manter o pH em torno de 9. A equação que globalmente descreve a precipitação é a seguinte:



A maior desvantagem deste método é a baixa pureza dos pós precipitados que geralmente é condicionada pela pureza do nitrato de cálcio. As partículas obtidas por este processo apresentam normalmente grandes quantidades de amónia o que exige elevado número de lavagens para a sua remoção. A segunda combinação de reagentes é mais vantajosa do que a primeira para a produção industrial visto que o único subproduto que gera é água. A equação global que se aplica neste caso é a seguinte:



Este processo apresenta também alguns inconvenientes, nomeadamente a baixa cristalinidade que caracteriza as partículas precipitadas [30].

A síntese hidrotérmica é uma técnica de precipitação que envolve elevadas pressões e temperatura e que, no caso da hidroxiapatite, apresenta por vezes problemas associados à presença de impurezas na estrutura cristalina de Hap [14].

A técnica de electrocristalização tem sido bastante usada devido ao facto do controlo processual ser simples, de possibilitar uma grande variedade composicional, e de permitir precipitar sobre superfícies e assim revestir materiais com geometrias complexas. No entanto esta técnica também induz a introdução de impurezas nas partículas finais, e a formação do fosfato de cálcio amorfo. Segundo alguns estudos recentes o fosfato de cálcio amorfo é visto como um precursor da apatite biológica e pode ser facilmente transformado em hidroxiapatite carbonatada que por sua vez possui um papel positivo na osteocondução e osteoindução visto que é mais reabsorvível e induz uma maior calcificação do osso do que a hidroxiapatite pura [35].

Uma outra técnica muito conhecida mas pouco utilizada na síntese de partículas fosfocálcicas é a atomização de soluções. Relativamente às anteriormente apresentadas esta técnica apresenta a vantagens de produzir num único passo e num curto espaço de

tempo os pós fosfocálcicos. Normalmente a precipitação de partículas de Hap ocorre quando a solução de cálcio e fósforo que alimenta o atomizador é vaporizada para o interior de uma câmara aquecida. Mediante os fenómenos de transferência de calor e massa em torno de cada gotícula ocorre a precipitação de partículas de Hap. As soluções de cálcio e fósforo usadas são normalmente muito sensíveis a pequenas variações de temperatura, e consequentemente pode ocorrer precipitação antes de serem vaporizadas o que dificulta o controlo do processo, razão pela qual a atomização de soluções de fosfato de cálcio é um método menos utilizado do que outros já referidos.

A morfologia das partículas fosfocálcicas assume um papel muito importante no desempenho dos materiais em meios fisiológicos. Um dos tipos de morfologias que tem despertado interesse é o de grânulo poroso, visto que se adequa à junção de transportador de fármacos e/ou de moléculas de interesse biológico, e por outro lado tem sido recomendado em detrimento de outras morfologias para a minimização de reacções inflamatórias e indução da osteointegração [36, 37].

A obtenção de grânulos porosos de hidroxiapatite pode ser conseguida através de diversas técnicas tais como a atomização de suspensões [22, 38] o método de expulsão de gota [39], a utilização de líquidos imiscíveis [37], a extrusão [40] e a peletização [36].

Segundo a literatura o método de expulsão de gota é um processo simples, realizado á temperatura ambiente e que não necessita de solventes orgânicos, o que torna especialmente indicado para ser usado como transportador de enzimas [39]. Quanto ao método de líquidos imiscíveis, mostrou ser um processo de obtenção de grânulos mais complexos mas com os inconvenientes de utilizar por vezes agentes orgânicos que podem ser tóxicos e prejudiciais para o organismo [37]. A técnica de extrusão reportada na literatura é exposta de uma forma pouco detalhada percebendo-se no entanto que é possível obter grânulos de tamanho variável, entre 200 e 400µm, e com poros de tamanho compreendido entre 5 e 25 µm [40].

A técnica de atomização é um processo com larga utilização industrial e envolve essencialmente a formação e a secagem de uma gota de liquido. A aglomeração de pós finos, grânulos ou agregados por um processo contínuo pode ser conseguida através da atomização de soluções líquidas, de emulsões ou de suspensões. Nos pós obtidos por atomização é possível controlar com precisão a humidade final, a homogeneidade e a morfologia final dos aglomerados [41, 42]. A utilização da técnica de atomização apresenta

vantagens relativamente a outras técnicas de obtenção de grânulos, pois permite obter materiais com diferentes porosidades e ainda a esterilização dos grânulos [43]. Convém no entanto referir que o processo de atomização de soluções e/ou suspensões não é exclusivo da indústria cerâmica, existindo outras indústrias tais como a química, a alimentar, a farmacêutica, a de fertilizantes, a de polímeros, a de resinas e a de agentes biológicos que também recorrem a esta técnica de granulação [42-44].

A atomização tem sido usada para a preparação de sistemas de libertação controlada de fármacos (SFL), porque possibilita a incorporação do fármaco nos grânulos na etapa de formação dos mesmos. Muitos são os estudos reportados na literatura sobre a atomização de solução ou suspensão de fármacos, em que normalmente a solução ou suspensão base é de natureza polimérica. Esses estudos documentam a influência dos parâmetros de atomização como a temperatura, a velocidade de sucção, o tempo de residência dos grânulos na câmara de secagem, as características das soluções e o grau de dispersão do fármaco nas propriedades dos pós obtidos [45, 46]. Muitos dos SLF obtidos por atomização devido ao seu tamanho e características não são utilizados tal como preparados, mas antes colocados posteriormente no interior de cápsulas poliméricas, ou prensados na forma de comprimidos [44].

Alguns dos materiais fosfocálcicos porosos obtidos por atomização tem sido utilizados como SLF sendo no entanto o carregamento do fármaco feito por adsorção, porque por essa via é possível libertar uma dada concentração de fármaco, por um longo período de tempo, num local específico do osso e ao mesmo tempo promover a formação de novo tecido ósseo [47]. Nesses casos o estudo do comportamento adsorativo dos materiais, é de particular importância para o doseamento da quantidade de fármaco a ser transportada pelo SLF.

1.4. Adsorção

Define-se por adsorção o fenómeno que ocorre entre a superfície de um determinado material e as moléculas de um dado fluido e mediante o qual se estabelece uma ligação química e/ou física entre a superfície e as referidas moléculas [48]. A adsorção envolve assim a migração de uma dada espécie para a superfície do sólido, migração essa relacionada com desequilíbrios de forças superficiais existentes no sólido adsorvente.

Devido a esse campo de forças ocorre a atracção de moléculas que estão próximas da superfície por um determinado período de tempo, normalmente denominado de tempo de retenção. Segundo a literatura o tempo de retenção das moléculas na superfície do adsorvente é proporcional à energia de adsorção. A capacidade adsortiva do material é fortemente influenciada pela sua macro e microporosidade e pelas características das moléculas do adsorbato [48, 49]. Na Figura 6 apresenta-se esquematicamente o processo de adsorção [50].

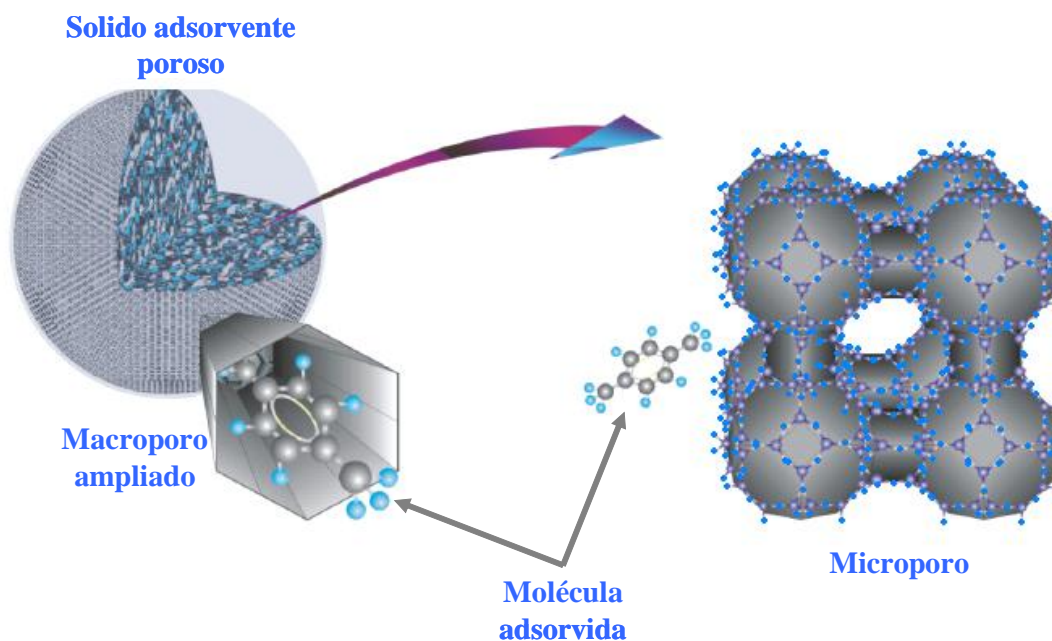


Figura 6- Esquema representativo do processo de adsorção de moléculas em sólidos porosos com macro e micro porosidade, adaptado da ref. [49].

Quando uma solução com uma determinada composição química entra em contacto com o material sólido adsorvente, ocorre adsorção das espécies químicas presentes na solução pelo sólido e, após um período de tempo suficiente, estabelece-se o equilíbrio entre os dois meios. Quando se atinge o equilíbrio, a quantidade adsorvida por um sólido é tanto maior quanto maior for a área superficial do adsorvente. O processo de adsorção é dependente de variáveis tais como: a temperatura, a pressão e a transferência de massa envolvida no sistema adsorbato-adsorvente [48].

1.4.1. Adsorção: Caracterização do equilíbrio

A adsorção de uma dada espécie pode ser avaliada quantitativamente através de determinadas correlações, as chamadas isotérmicas, que caracterizam a relação de equilíbrio entre a concentração dessa espécie na fase fluida (c) e a concentração da mesma espécie na fase adsorvente (w) a uma determinada temperatura. Os gráficos (w versus c) obtidos podem apresentar diversas formas, fornecendo informações importantes sobre mecanismos de adsorção (Figura 7). A isotérmica linear, passando pela origem, caracteriza a situação em que a quantidade adsorvida é proporcional á concentração do fluido. As isotérmicas convexas descrevem situações favoráveis ou extremamente favoráveis à adsorção pois grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de soluto.

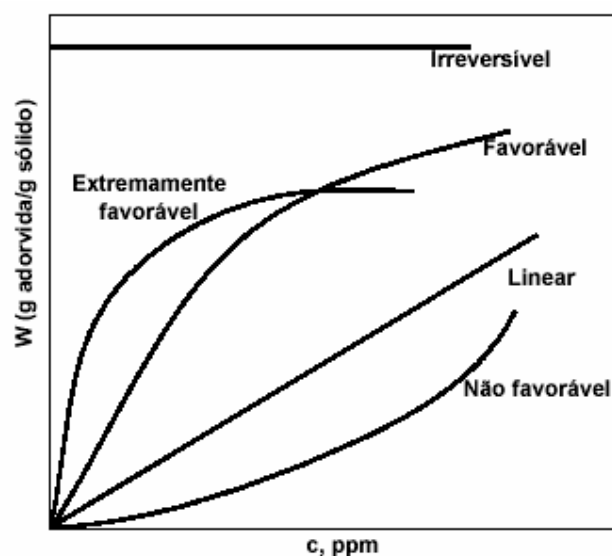


Figura 7- Isotérmica de adsorção. Adaptada da ref [47]

Mas até hoje o entendimento e a previsão do modo como os processos de adsorção ocorrem tem-se revelado complicado, visto existirem muitos factores que podem influenciar a adsorção e a forma final da isotérmica, tais como: o pH, a temperatura, o tipo de adsorvente, a dimensão do elemento adsorvido, e o estado da superfície, entre outros [51, 52].

São numerosas as isotérmicas referidas na literatura, sendo as mais frequentemente utilizadas em estudos de adsorção as seguintes: a isotérmica de Langmuir [53], a de

Freundlich [54], a de Dubinin-Radushkevich [48], a de Temkin, a de Giles e a de Brunauer, Emmett e Teller [49].

Por serem frequentemente utilizadas para descrever resultados de adsorção de compostos químicos ou biológicos na superfície de sólidos porosos, analisar-se-ão seguidamente as isotérmicas de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich.

1.4.1.1. Isotérmica de Langmuir

Langmuir em 1918 foi o primeiro investigador a propor um modelo de adsorção suportado por uma base teórica coerente, fundamentando-se em considerações cinéticas [48]. A teoria de Langmuir descreve a adsorção de uma espécie em monocamada, numa superfície ideal, considerando que o processo de adsorção é localizado, ou seja, que cada molécula adsorvida ocupa um único local, sendo todos os locais de adsorção energeticamente equivalentes. Esta teoria admite ainda que cada local pode acomodar apenas uma única molécula ou átomo e que não ocorrem interações entre as moléculas adsorvidas em locais vizinhos. A equação que descreve esta isotérmica é a seguinte [55]:

$$C_e/Q_e = (1/K_L) + (a_L/K_L) \cdot C_e \quad [56] \quad (\text{Eq.3})$$

onde Q_e (mol/g) corresponde á quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente, C_e (mol/L) é a concentração de soluto em solução na condição de equilíbrio, a_L (L/mmol) designa a concentração máxima de soluto adsorvido e K_L é a constante de equilíbrio de Langmuir (L/g) [57]. O parâmetro a_L (L/mol) relaciona-se com a energia de adsorção [58]. A partir da razão K_L/a_L é possível determinar a capacidade de saturação teórica da monocamada Q_o , através das seguintes equações [58, 59]:

$$Q_o = K_L/a_L \quad [56] \quad \text{ou} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$1/Q_o = N_A \sigma^o / A_{sp} \quad [60] \quad (\text{Eq. 5})$$

onde N_A é o numero de Avogadro's, A_{sp} é a área superficial específica do adsorvente e σ^o a área ocupada por uma molécula de adsorvido [60].

No sentido de documentar a frequência com que a isotérmica de Langmuir tem sido invocada para descrever resultados experimentais referentes à adsorção de diferentes tipos

de moléculas em superfícies fosfocálcicas, apresentam-se seguidamente alguns estudos reportado na literatura.

Chirdon estudou a adsorção de um aminoácido, que possuía um grupo Catechol (3,4-dihidroxifenil) na superfície da hidroxiapatite e comparou os seus resultados com outros realizados com aminoácidos com grupos polares diferentes. Verificou que a quantidade de material adsorvido na superfície da hidroxiapatite dependia fortemente da massa molecular do aminoácido, do tipo de locais de adsorção e de propriedades como a polaridade dos solventes e o pH que podiam afectar a protonação dos solutos e a velocidade de adsorção e, consequentemente, os mecanismos de adsorção. Além disso, apurou que o tipo de isotérmica que melhor descrevia os processos de adsorção era a de Langmuir [61]. Gamal e Nikos também realizaram estudos de adsorção de aminoácidos em hidroxiapatite e concluíram igualmente que a adsorção de aminoácidos era convenientemente descrita por uma isotérmica de Langmuir [53, 62]. Benaziz utilizou dois tipos de aminoácidos, o O-Phospho-L-Serine e o L-Serine, em ensaios de adsorção em partículas de apatite pouco cristalinas e, à semelhança dos autores anteriormente referidos, verificou que a isotérmica de Langmuir era a que melhor descrevia os processos [63]. Dos estudos realizados com aminoácidos pelos diferentes autores parece poder presumir-se que a adsorção de aminoácidos em materiais à base de hidroxiapatite é geralmente descrita por uma isotérmica de Langmuir, sendo pouco relevantes as características das partículas e/ou do aminoácido.

Devido á importância das proteínas nos sistemas biológicos, são também vários os estudos realizados com diferentes tipos de proteínas em materiais fosfocálcicos. Fargues realizou estudos de adsorção de hemoglobina e de soro de albumina de bovino (BSA) num gel de hidroxiapatite e observou que a quantidade de proteínas adsorvidas era dependente do pH da solução de adsorção, constatando que a isotérmica de Langmuir era a que melhor se ajustava aos seus resultados experimentais [51]. Bouropoulos utilizou na adsorção por partículas de Hap, a proteína amelogenin encapsulada em nanoesferas de polímero. Segundo o autor estas nanosferas com proteína possuem a capacidade de numa fase inicial promoverem a nucleação e crescimento de cristais de apatite. Verificou que o modelo de Langmuir se aplicava bem aos seus resultados e que a adsorção das nanoesferas na superfície da hidroxiapatite ocorria possivelmente de uma forma selectiva e em locais específicos [64]. A. Yin referiu que o modelo de Langmuir tem sido muito utilizado para

descrever uma variedade de fenómenos de adsorção incluindo a de proteínas, particularmente a da histidine na hidroxiapatite e na superfície do esmalte dos dentes [57]. Reportou-se também que a hidroxiapatite tem a capacidade de adsorver fortemente proteínas não cologénicas que favorecem a mineralização do osso e que existe uma grande afinidade entre a superfície da hidroxiapatite e alguns péptidos que regularmente participam no estágio inicial da formação do tecido ósseo [62].

Misra realizou vários estudos de adsorção em partículas de hidroxiapatite com variados compostos como citratos metálicos alcalinos e o N-feniglicinato de potássio. Constatou que, independentemente do tipo de elemento adsorvido, o modelo que melhor descrevia a adsorção de espécies na superfície de partículas de hidroxiapatite era o de Langmuir. López-Macipe realizou estudos com espécies citrato a duas temperaturas diferentes, à temperatura ambiente e à temperatura fisiológica e a dois valores de pH (6 e 8) tendo verificado que os resultados obtidos se apresentavam concordantes com o modelo de adsorção de Langmuir [58]. Num outro estudo de adsorção com ácido cítrico, em partículas de hidroxiapatite sintetizadas por um processo de precipitação num reactor descontínuo a diferentes temperaturas e ao mesmo valor de pH, Enrique Vega, mostrou que as isotérmicas de adsorção obtidas obedeciam à equação proposta por Langmuir. Além disso o autor obteve conclusões semelhantes às de López-Macipe no que se refere à interacção entre iões cálcio e aniões citrato na interface do sólido com a solução: o ião citrato forma um complexo muito estável com os ião cálcio da hidroxiapatite, ligando-se de uma forma bidentada, ou seja, o ião citrato liga-se a dois iões cálcio [65].

Dos estudos apresentados conclui-se pois que o modelo de Langmuir descreve bem os processos de adsorção de espécies muito variadas na superfície de diferentes partículas de hidroxiapatite.

1.4.1.2. Isotérmica de Freundlich

Um outro tipo de isotérmica muito utilizada para traduzir fenómenos de adsorção, é a isotérmica de Freundlich [59, 60], tendo sido uma das primeiras equações empíricas proposta para descrever resultados de adsorção. Originalmente a equação era apenas utilizada como uma correlação empírica de dados experimentais, sendo só mais tarde deduzida matematicamente por Appel em 1973. Por ser usada numerosas vezes por

Freundlich foi-lhe atribuído o seu nome, passando a ser conhecida por modelo de adsorção de Freundlich [66]. O modelo é obtido assumindo que a superfície é energeticamente heterogénea no sentido em que a energia de adsorção varia de local a local e, para cada local, a adsorção é independente da que ocorre nos restantes locais. Outra consideração subjacente à teoria de Freundlich é a que em cada local só adsorve uma única molécula. Para além das considerações referidas, o modelo de adsorção de Freundlich considera ainda que o processo de adsorção apresenta uma distribuição exponencial do calor de adsorção a partir da monocamada [60].

A equação da isotérmica de Freundlich é dada por:

$$\log Q_e = \log K_F + (1/n)\log C_e \quad (\text{Eq. 6})$$

em que:

C_e (mol/L) corresponde à concentração da espécie adsorvida na condição de equilíbrio e Q_e (mol/g) à concentração da espécie adsorvida, K_F é a constante de Freundlich que indica a capacidade de adsorção do material e n o expoente de Freundlich que designa a reactividade dos locais energéticos do material em estudo. K_F e n são, geralmente, dependentes da temperatura [48]. Os parâmetros K_F e n podem ser determinados a partir da equação (Eq.6) quando conhecidos os valores experimentais de C_e e de Q_e , estando aqueles relacionados com a distribuição dos locais energéticos de adsorção (n) e da capacidade de adsorção do material adsorvente (K_F) [60, 67].

Apesar de ser uma das isotérmicas mais utilizadas para descrever os processos de adsorção em superfícies energeticamente heterogéneas, são poucos os estudos realizados com materiais fosfocálcicos que são descritos pela isotérmica de Freundlich.

Resultados obtidos para a adsorção do anticancerígeno cisplatina $((\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2)$ em cristais de hidroxiapatite indicaram que o processo de adsorção do fármaco na superfície das partículas era descrito por uma isotérmica de Freundlich [54]. Porém, os autores efectuaram um outro estudos de adsorção com o mesmo fármaco, cisplatina, em nanopartículas de fosfato de cálcio e hidroxiapatite em soluções tampão de fosfatos a duas temperaturas diferentes, 24 e 37°C. Concluíram que à temperatura ambiente os processos de adsorção eram descritos por uma isotérmica de Freundlich, enquanto que à temperatura fisiológica a equação que melhor descrevia os resultados experimentais era a de Langmuir [68]. Os resultados obtidos deste estudo sugerem que a variação da temperatura da solução tampão de fosfatos é suficiente para alterar os processos de adsorção para este tipo de

partículas específicas. Benaziz efectuou estudos de adsorção de dois aminoácidos, a fosfoserine e a serine, na superfície de partículas de apatite pouco cristalinas com o objectivo de simular o que ocorre no meio fisiológico. Os resultados obtidos revelaram-se diferentes dos esperados pelo autor no que respeita ao tipo de isotérmica que neste caso se aplicou aos resultados experimentais. Apesar das suas expectativas relativamente à isotérmica de Langmuir, Benaziz concluiu que a adsorção dos aminoácidos era descrita por um modelo de adsorção de Freundlich [63]. O modelo de adsorção de Freundlich também tem sido apontado para descrever a adsorção na superfície de outros materiais para além dos compostos fosfocálcicos. Como exemplo, cite-se o trabalho de Yoshida que estudou a adsorção da proteína BSA num polímero duro de (DEAE) e verificou que a adsorção da proteína, fortemente dependente do pH do meio, era descrito pelo modelo de Freundlich [69]. Mesalam e seus colaboradores utilizando titanato sintético de ferro III no estudo do processo de adsorção de iões metálicos pesados, verificaram também que a equação de Freundlich era a que melhor descrevia a adsorção dos iões Zn^{2+} e Cd^{2+} , a diferentes concentrações de iões metálicos [70]. Doula realizou ensaios para testar o efeito da adsorção do cobre em caulinos, a quatro temperaturas diferentes, e verificou que a isotérmica de Freundlich se ajustava adequadamente à descrição dos resultados experimentais [71].

1.4.1.3. Isotérmica de Dubinin-Radushkevich

Dubinin, em 1966, desenvolveu um outro modelo matemático para descrever os processos de adsorção em sólidos porosos [48]. O modelo foi desenvolvido para o carbono activado, pois este apresenta uma estrutura complexa, com macroporos de tamanhos igual ou superior a 1000\AA e microporos da ordem dos 10\AA . Segundo o autor, é na rede dos microporos que reside a maior capacidade adsorptiva por causa da dimensão dos poros comparativamente á das moléculas adsorvidas. De acordo com o autor o mecanismo de adsorção nos microporos é completamente diferentes do que ocorre numa superfície ou num poro largo, onde a adsorção ocorre por um processo em camadas. Nos microporos, o mecanismo envolve o enchimento dos microporos pois, as forças de adsorção actuam em toda a área do microporo, e como consequência aumentam o potencial de adsorção que se

traduz num acréscimo do calor de adsorção nos microporos comparativamente com a superfície [48]. Esta isotérmica é descrita pela seguinte equação:

$$\ln Q_e = \ln q_m - \beta \varepsilon^2 \quad [56] \quad (\text{Eq. 7})$$

Sendo q_m a capacidade teórica de saturação da monocamada de Dubinin-Radushkevich (mmol/g), β o coeficiente de afinidade ou coeficiente de similaridade, e ε o potencial de Polanyi que está relacionado com a energia de adsorção, e é imutável para um adsorbente específico. O potencial de Polanyi pode ser calculado através da equação [72]:

$$\varepsilon = RT \cdot \ln(1 + (1/C_e)) \quad [56] \quad (\text{Eq. 8})$$

sendo R a constante dos gases perfeitos (8,31 J/molK) e $T(K)$ a temperatura absoluta a que decorre o ensaio. Para além das expressões matemáticas apresentadas, Dubinin-Radushkevich propõe também, com base na expressão matemática da isotérmica, o cálculo da energia livre de adsorção, E , a partir de equação:

$$E = 1/\sqrt{2\beta} \quad [56] \quad (\text{Eq. 9})$$

Os valores de E dão informação sobre os mecanismos de adsorção: se o valor estiver compreendido entre 8 e 16 KJ/mol o processo de adsorção é considerado químico; se ficar fora desse intervalo é reconhecido como um processo de adsorção físico [73].

Kovář analisou os processos de adsorção e absorção em carvão, e verificou que a isotérmica de Dubinin descrevia bem os resultados de adsorção [74]. Morales, nos seus ensaios, verificou também que a isotérmica de Dubinin se ajustava bem aos seus resultados experimentais referentes à adsorção do benzeno na superfície de polietileno (PET) [75]. Philip Pendleton estudou a influência da temperatura na adsorção de benzeno em microporos de sílica e concluiu que a adsorção se dava em duas etapas distintas: uma inicial que correspondia à adsorção nos macroporos e uma segunda referente à adsorção nos microporos. O autor observou também que a equação de Dubinin se aplicava aos seus dados experimentais [76].

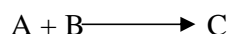
1.5. Adsorção: estudos cinéticos

A abordagem do processo de adsorção como uma reacção química permite tratá-la genericamente como uma reacção de ordem n. Dada assim pela equação:

$$dC/dt = -KC^n \quad (\text{Eq. 10})$$

Sendo dC/dt a variação da concentração adsorvida com o tempo t , e K a constante cinética da reacção.

Diversos modelos podem ser usados para expressar cinéticas de adsorção de um dado composto por um sólido. No entanto, as cinéticas de adsorção mais conhecidas e utilizadas são descritas por equações de pseudo primeira ordem [77, 78] ou pseudo segunda ordem [56] ou ainda pelo modelo de difusão intrapartícula [79]. A designação de pseudo ordem n aplica-se a situações particulares em que, por exemplo, as concentrações dos reagentes tem valores substancialmente diferentes. No caso de uma reacção de segunda ordem:



Cuja cinética seja descrita pela equação:

$$v = -dC_A/dt = K' C_A C_B \quad (\text{Eq. 11})$$

se a concentração do reagente, C_A , for muito superior à do reagente B, a concentração do reagente A não sofrerá grandes alterações durante a reacção. A concentração do reagente em excesso manter-se-á pois praticamente constante face à do reagente B. Nestas circunstâncias a equação da velocidade da reacção poderá ser aparentemente expressa apenas em função da concentração de B, isto é:

$$v = -dC_A/dt = K'' C_B \quad (\text{Eq. 12})$$

sendo no entanto $K'' = K' C_A$.

A equação cinética apresentada (equação 12) é assim designada por equação de pseudo primeira ordem, sendo também conhecida como equação de Lagergren [78] que é normalmente apresentada como:

$$dq_t/dt = K_1(q_e - q_t) \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde q_e e q_t são as quantidades adsorvidas no equilíbrio e no tempo t (mmol/L), respectivamente, e K_1 a constante cinética de pseudo primeira ordem (l/hora).

Após integração e aplicando a condição inicial $q_t=0$ para $t=0$ obtêm-se a equação:

$$\text{Log}(q_e - q_t) = \log q_e - (K_1/2.303) \times t \quad (\text{Eq. 14})$$

São vários os estudos de cinética de adsorção reportados na literatura para diferentes materiais. Vega analisou a adsorção de ácido cítrico por partículas de hidroxiapatite e verificou que os parâmetros cinéticos obtidos eram concordantes com uma cinética de reacção de pseudo primeira ordem [65]. Mesalam e seus colaboradores utilizando titanato sintético de ferro III no estudo de adsorção de iões metálicos pesados, verificaram que a cinética de reacção para a adsorção dos iões Zn^{2+} e Cd^{2+} , era descrita por uma equação de pseudo primeira ordem [70]. Özacar estudou a adsorção de corantes, obtidos a partir de soluções ácidas, na superfície de partículas de alunite calcinada e de grânulos de carbono activado. Verificou que a cinética de reacção de adsorção dos diferentes materiais era descrita por uma reacção de pseudo primeira ordem [59]. Um outro estudo de cinética de adsorção com corantes vermelhos foi realizado por Wahab em cascas de arroz que verificou que a adsorção é descrita por uma reacção de pseudo primeira ordem [80].

Todavia tal, como foi referido, os estudos de cinética de reacção não se têm limitado à constatação da cinética de pseudo primeira ordem. A cinética de pseudo segunda ordem, cuja designação assenta em pressupostos semelhantes aos da pseudo primeira ordem, mas com a diferença que existe mais um componente na reacção, também têm sido observada nalguns casos. A equação que descreve esta cinética é a seguinte:

$$dq_t/dt = K_2(q_e - q_t)^2 \quad (\text{Eq. 15})$$

sendo K_2 a constante cinética de pseudo segunda ordem (g/mmol.h) e q_e e q_t as quantidades de adsorvente adsorvidas no equilíbrio e no tempo t , respectivamente.

Özacar avaliou a cinética de reacção na adsorção de fósforo em partículas de alunite calcinada e aferiu que a reacção era descrita por um processo de pseudo segunda ordem [56]. Ho comparou estudos de cinética de reacção realizados por outros autores e verificou que muitos deles estavam descritos na literatura como uma ordem de reacção diferente daquela que deveriam ter. Os estudos de Ho basearam-se apenas em ajustes ao modelo de reacção de pseudo segunda ordem [81]. Chiou observou o comportamento de adsorção dos

corantes AAVN e RB4 em partículas esféricas de quitosano. Constatou que os seus resultados experimentais se ajustavam ao modelo cinético de pseudo segunda ordem [77].

Um modelo de cinética muito utilizado para descrever a adsorção em materiais porosos é o modelo de difusão intrapartícula. Verifica-se frequentemente que este modelo coincide com outros modelos, nomeadamente o de pseudo primeira e o de pseudo segunda ordem, na descrição de resultados experimentais durante um período limitado de tempo de adsorção [79]. Segundo o modelo de difusão intrapartícula a quantidade adsorvida q_t ao fim do tempo t segue a relação:

$$q_t = K_p t^{1/2} \quad (\text{Eq. 16})$$

onde K_p é a constante de difusão intrapartícula ($\text{mmol/gh}^{1/2}$).

Özcan realizou ensaios de adsorção de corante azul 193 no mineral espirolite. Verificou que nos primeiros 60 minutos a cinética de reacção era descrita por um modelo de difusão intrapartícula [82]. Um outro estudo do mesmo autor sobre a adsorção de fósforo em alunite calcinada, conduziu a um resultado final idêntico ao anterior, ou seja, no período de tempo entre os 5 e os 60 minutos a difusão intrapartícula descrevia também a cinética de adsorção, embora durante todo o tempo restante fosse descrita por uma cinética de pseudo segunda ordem [56]. Namasivayan e seus colaboradores verificaram que num período de tempo finito de adsorção a cinética de difusão intrapartícula se ajustava adequadamente aos resultados de adsorção de Cd(II) em hidróxido de Ferro(III)/Crómio(III) [83].

1.6. Fármaco 5-Fluorouracil

O composto 5-fluorouracil (5-FU) foi sintetizado por Duschinsky em 1957, tendo sido descoberta a sua actividade anti-cancerígena por Heidelberger e seus colaboradores [84, 85]. O 5-fluorouracil é um composto pouco lipofílico com um comportamento anti-metabólico [86], significando que interfere na produção do DNA, impedindo o crescimento e a multiplicação das células [86]. Sabe-se que o composto tem um largo espectro de actividade contra tumores sólidos tais como o cancro do peito, o do esófago, o do fígado, o do pulmão, o do pâncreas, o da pele e cancros do sistema gastrointestinais tais como os do estômago o do intestino e o do cólon [84, 85, 87-90].

Quimicamente o 5-Fluorouracil pode ser considerado como um derivado da base timina onde o grupo metilo é substituído por um átomo de flúor [89]. Na Figura 8 apresenta-se uma representação esquemática da estrutura química do 5-FU. Na molécula de 5-FU, dois dos átomos de hidrogénio estão ligados a átomos de azoto e um terceiro a um átomo de carbono do anel da pirimidina. O 5-fluorouracil é um ácido fraco, apresentando um pKa aparente de 7,98. Numa solução de fosfatos a pH 7,3 apresenta-se parcialmente dissociado, sendo o seu grau de dissociação de cerca de 20% [91]. É um fármaco sensível á luz e precipita a baixas temperaturas. A 25°C a sua solubilidade em água é de 12,2 mg/ml e o seu peso molecular é de 130,08 [92].

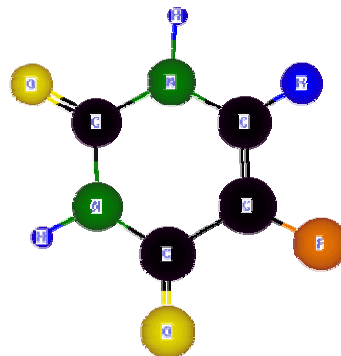


Figura 8-Estrutura química do 5-FU

Contudo trata-se de um composto extremamente tóxico e por vezes é impossível administrá-lo durante um período longo de tempo por forma a ter o efeito desejado [84]. Normalmente é administrado por injeção várias vezes ao dia por forma a manter uma concentração adequada no sangue. No entanto como possui um tempo de vida curto no plasma humano (10-20 minutos) a sua eficácia é limitada, devido ao seu rápido metabolismo no fígado [43, 87, 93].

O uso de 5-FU provoca toxicidade gastrointestinal e mielotoxicidade (toxicidade do sistema linfático) e desordem na medula óssea [43, 87]. Têm sido desenvolvidos vários esforços com o objectivo de reduzir o seu efeito nefasto, nomeadamente através do seu encapsulamento em diversos materiais, tais como: o D,L co-ácido polilactico/glicolico biodegradável [43, 94-96], ou o poli (éster-éter-éster) biodegradável [91], ou o polímero biodegradável alginato [97], em vesículas de gel fosfolipído [87], o poli(metiledino malonato 2.1.2) [98], o poli(N-vinilpirrolidinono) [99], o poli(orto éster) [100, 101], e em polímeros sensíveis ao pH como exemplo o Eudragit P-4135F [102]. Mais recentemente, e por forma a aumentar o seu tempo de vida e diminuir o seu efeito nefasto, tem havido um grande esforço no desenvolvimento de prodrugas que permitem a passagem do 5-FU pelo fígado sem este ser catabolizado e, para além disso, utilizam o nível de diferenciação enzimático do tumor para permitirem que o 5-FU atinja de forma mais eficaz e rápida o

tecido cancerígeno [103]. Normalmente o 5-FU é administrado conjuntamente com outras substâncias denominadas modeladores de acção do 5-FU, que melhoram a sua capacidade de resposta, sendo o leucovorin o mais utilizado em várias dosagens e regimes. Além deste existem outras substâncias tais como: o metatrexato, o uridine e o PALA [103].

No entanto existe uma clara necessidade de entender o comportamento do 5-FU no sistema *in vivo*, que compreende, muito sucintamente em três etapas distintas: a primeira corresponde ao transporte do fármaco até ao tumor, a segunda identifica-se com a capacidade das células cancerígenas de reagirem com o fármaco e a última etapa relaciona-se com a capacidade do fármaco actuar nas moléculas no interior das células do tumor. O transporte do fármaco até ao tumor depende do fluxo de sangue e da profundidade do tumor. Com essa informação é possível determinar a quantidade de fármaco que deve ser administrada para actuar no tumor, quantificação essa que no entanto se tem mostrado extremamente difícil. A segunda fase depende da capacidade do 5-FU em difundir-se pelo tumor (nesta etapa a pressão osmótica possui grande importância) e dos processos de transporte que regulam a entrada do 5-FU nas células cancerígenas. Finalmente à fase em que o 5-FU já foi levado até as células cancerígenas, segue-se a sua sujeição a metabolismos intracelulares, fase esta conhecida como fase de metabolismo. Considerando estes mecanismos pode assumir-se que no interior das células predominam processos anabólicos. A dificuldade de avaliar a quantidade de 5-FU que foi administrada e da que é anabolizada pelas células dificulta o desenvolvimento de modelos farmacocinéticos e farmacodinâmicos [103]. No entanto, estudos realizados usando um sistema modelo, permitiram verificar que após 20 minutos da administração a maior parte do 5-FU se encontra no meio intracelular, embora estes mecanismos não sejam ainda completamente entendidos. Na Figura 9 representa-se esquematicamente o processo de transporte do 5-FU até ao interior das células cancerígenas [103].

O mecanismo de actuação do 5-FU não termina com a sua chegada as células cancerígenas, pois é no seu interior que ocorrem os fenómenos mais importante de actuação do 5-FU. No interior das células o 5-FU pode ser rapidamente e extensivamente catabolizado pela enzima dihidropirimidina dehidrogenase (DPD). Na mucosa intestinal existe uma grande variedade de enzimas DPD em actividade que podem causar absorções variadas após a dosagem oral. A actividade dessas enzimas oscila ao ritmo da concentração de 5-FU existente no plasma, provocando assim flutuações da concentração administrada

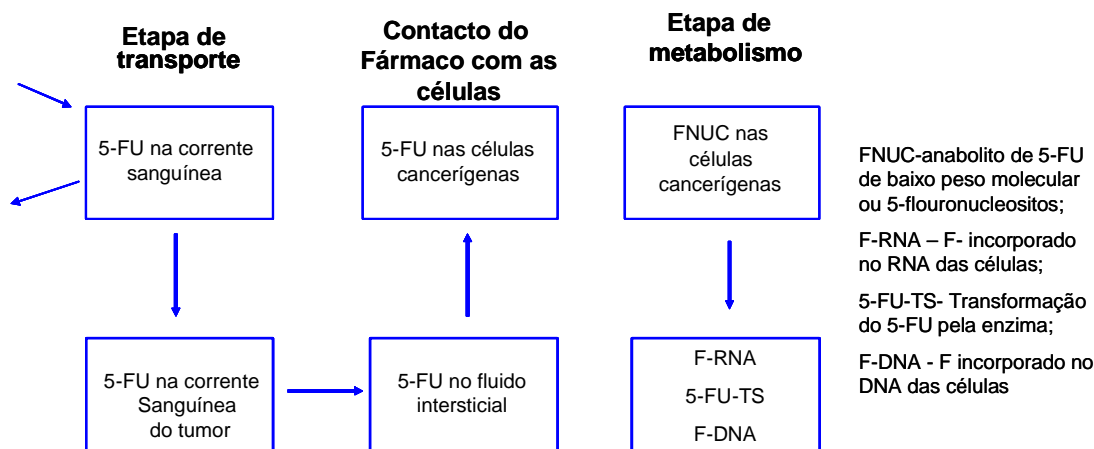


Figura 9- Esquema representativo do transporte do fármaco 5-FU no corpo humano. Adaptado da ref [102].

[93]. O restante 5-FU é activado de diversas formas, sendo uma das mais importantes a formação do monofosfato de fluorodeoxiuridina (5-FdUMP), ou seja a formação de um forte inibidor da enzima timidilato sintetase que transforma 2-acido deoxiuridílico em acido timidílico [104, 105]. Uma outra forma de actuação do 5-FU corresponde á formação do trifosfato fluorouridine (5-FUTP) que subsequentemente é incorporado no RNA provocando a inibição do crescimento das células e posteriormente a sua morte. Porém o trifosfato de fluorodeoxiuridina pode também ser incorporado no DNA [104, 105]. Alguns estudos permitiram constatar que nos humanos 60 a 90% do 5-FU é catabolizado no fígado enquanto 10 a 20% é excretado na urina sem sofrer qualquer alteração [93, 104].

1.7. Estudos de libertação por dispositivos cerâmicos fosfofocálcicos

Os cerâmicos fosfofocálcicos possuem a vantagem de serem compatíveis com os tecidos e os fluidos corporais, serem de baixo custo e de fácil produção, apresentando-se por isso como candidatos apetecíveis para aplicações biomédicas [106]. É sabido que os cerâmicos fosfofocálcicos, quando preparados com características apropriadas, podem ligar-se ao tecido ósseo e “atrair” proteínas morfogénicas ósseas existentes na circulação e simultaneamente transportar consigo fármacos, péptidos bioactivos, células ósseas, e outras substâncias, o que os torna potenciais libertadores de fármacos úteis para aplicação em engenharia de tecidos [7]. De facto alguns fosfatos de cálcio cerâmicos têm sido usados como transportadores e libertadores de numerosos tipos de fármacos tais como: antibióticos,

insulina, aspirina, hormonas, proteínas, coumadin, fármacos anti-cancerígenos, indomethacin, epinephrin, chorhexidina e azidothymidina, etc [107, 108]. Os factores que regulam a adsorção e a libertação de compostos químicos específicos *in vitro* dos materiais baseados em hidroxiapatite não são ainda completamente conhecidos, e, por esse motivo, continua a investigar-se o papel das características físicas e químicas desses materiais nomeadamente a composição química, a estrutura cristalina, a porosidade, o tamanho de partícula, a área superficial bem como o das características das soluções envolvidas tais como o pH, a força iónica e a concentração dos iões constituintes não só a adsorção mas também na libertação de compostos químicos específicos. Tendo em vista a revisão dos conhecimentos actuais sobre este tema específico, apresentam-se seguidamente estudos de libertação de substâncias tão variadas como: esteróides, anti-cancerígenos, antibióticos e proteínas por materiais fosfocálcicos.

Bajpai e seus colaboradores em 1980 desenvolveram e patentearam suportes cerâmicos libertadores de fármacos à base de alumina e de fosfato de cálcio (ALCAP). Os autores prepararam por prensagem e sinterização composições de óxido de alumínio, óxido de cálcio e pentóxido de fósforo (ALCAP) obtendo um cerâmico cristalino reabsorvível *in vivo*, com uma estrutura de poros interconectados, que mostrou ser um material compatível e não tóxico. O ALCAP, mostrou ter a capacidade de libertar esteróides continuamente durante 12 meses, quando impregnado com ácido poliláctico para sustentar a libertação através dos poros [109]. Para além de esteróides as cápsulas foram utilizadas para libertar outros fármacos e químicos, nomeadamente a azidotimidina (droga administrada a doentes com sida), a testosterona e a albumina do soro bovino [7]. Além desse material, os mesmos autores desenvolveram e patentearam em 1988 um outro cerâmico libertador, ZCAP formado uma mistura de óxido de zinco, de cálcio e de pentóxido de fósforo [110]. Segundo os autores, a vantagem de usar ZCAP como libertador de drogas em implantes resulta do facto de ocorrer simultaneamente a libertação de zinco, em pequenas quantidades, que se pensa ter um papel importante no processo de cicatrização de feridas [111].

Estudos com hidroxiapatite e fosfato tricálcico, quer na forma de blocos porosos, quer na forma de grânulos, têm sido realizados para avaliar a sua utilização como libertadores de drogas anti-cancerígenas tais como: o *metotrexato* [112, 113], o *cisplatin* [68, 114] e o *doxorubicin* [8]. A maior parte dos tratamentos com anti-cancerígenos é limitado pela

toxicidade do fármaco. Por exemplo, estudos realizados *in vivo* com o anti-cancerígeno *metotrexato* (MTX) usado no tratamento de osteosarcomas osteogénicos, revelaram que a dosagem e a frequência da administração depende da toxicidade do fármaco no tecido da mucosa bucal e gastrointestinal com hematoma. Segundo a literatura, para este fármaco específico, recomenda-se uma administração lenta no local visto que a sua eficiência depende do tempo de contacto com as células e não da concentração, tanto mais que elevadas concentrações de fármaco na corrente sanguínea podem provocar efeitos secundários [115]. Lebugle e seus colaboradores efectuaram estudos de libertação. Com um suporte cerâmico obtido por prensagem de uma mistura de apatite deficiente em fosfato de cálcio, dextran e variadas quantidades de MTX. Verificaram que a libertação do MTX no tempo era lenta e prolongada devido a fenómenos de adsorção/ desorção do MTX na superfície da apatite deficiente. Os, estudos de libertação e de biocompatibilidade efectuados *in vivo* em ratos, mostraram também que a concentração de MTX existente na circulação sanguínea se mantinha inferior ao nível tóxico, permanecendo cerca de 20% no implante após 7 dias, e que ocorria simultâneamente a degradação do implante e a formação do novo osso [115].

M. Itokazu impregnou, servindo-se de um sistema de vácuo, diferentes quantidades de fármaco MTX em blocos porosos de hidroxiapatite. Verificou que ao final de doze dias os blocos ainda libertavam uma concentração de 0,22 a 0,32 µg/ml de MTX que, segundo o autor, é suficientemente efectiva contra as células tumorais, não tendo no entanto realizado estudos *in vivo* [112]. Netz realizou estudos de libertação com *cisplatin* e mostrou que materiais cerâmicos com porosidades diferentes libertam quantidades de droga diferentes sendo, após 168h de libertação, a quantidade libertada inferior a 50% [114]. Barroug adsorveu *cisplatin* em nanopartículas de fosfato de cálcio com diferentes cristalinidades e constatou que a quantidade de *cisplatin* libertada ao final de vinte dias era a mesma para partículas com diferentes cristalinidades, sendo de aproximadamente 70 por cento da quantidade adsorvida. Observou também que as nanopartículas menos cristalinas libertavam o fármaco mais lentamente. Realizou também estudos *in vitro* a duas temperaturas diferentes, 24 e 37°C e constatou que a taxa de libertação aumentava ligeiramente com a temperatura. Como forma de testar a actividade do fármaco após adsorção em nanopartículas de fosfato de cálcio, realizou também estudos de citotoxicidade celular [68]. Genin e seus colaboradores prepararam e patentearam um

sistema de libertação composto por grânulos de hidroxiapatite e *doxorubicin*. Inicialmente prepararam uma mistura de hidroxiapatite e doxorubicin que depois secaram e granularam por um método de moldagem cilíndrico que consistiu basicamente em fazer passar a mistura seca por um cilindro com um orifício de diâmetro variável, e conseguindo assim obter grânulos com tamanho compreendido entre 5 µm e 10 mm. Verificaram que após 10 horas cerca de 40% da droga havia sido libertada [8]. Uma libertação periódica de dextrorubicin pode ser obtida, por exemplo, recorrendo a sistemas libertadores com configurações específicas obtidas por prensagem. Neste tipo de sistemas, a libertação inicial é rápida tornando-se seguidamente mais lenta e podendo prolongar-se até às 240 horas [8].

Os vários tipos de sistemas de libertação anteriormente referidos estão particularmente direccionados para o tratamento do cancro. De todos os agentes anti-cancerígenos existentes hoje em dia, o mais efectivo no tratamento do cancro do osso é o *doxorubicin*. Nestes casos a concentração da droga nos locais cancerígenos é normalmente muito baixa porque os ossos em geral são órgãos pouco irrigados pelo sangue [8].

Merecem também uma breve referencia os SLF de natureza polimérica já desenvolvidos e patenteados, em que o comportamento de libertação é substancialmente diferente, visto que a libertação de substâncias por esses sistemas envolve uma primeira etapa correspondente ao inchamento do SLF (devido a fenómenos de absorção de solução do meio libertador) e à libertação simultânea do fármaco, seguida de uma segunda fase em que ocorre a degradação da parte polimérica do SLF [45, 116-118].

No tratamento de doenças do osso tem merecido particular interesse os SLF para utilização com antibióticos. Os antibióticos são usualmente prescritos para combater as bactérias nos processos infecciosos [119]. As infecções do osso merecem uma particular atenção, porque a circulação do sangue nos tecidos ósseos é fraca, o que pressupõem que são necessárias grandes quantidades de antibiótico para se atingir o nível terapêutico desejado na região afectada [120]. Essa grande concentração de antibiótico no local da infecção, pelo menos por um período curto de tempo, pode ser obtida através da incorporação do antibiótico num libertador que possa ser implantado no local.

Estudos com *vacomicin*, um antibiótico glicopeptídico utilizado no tratamento da osteomielite [121, 122], mostraram que os diferentes métodos de consolidação de pós de Hap (no caso em estudo a compactação dinâmica e a compressão isostática) não

influenciam a quantidade de droga libertada pelo cerâmico sendo a compactação, segundo os autores, um método muito promissor porque garante a integridade dos antibióticos [119, 121, 122].

Os compósitos de poli-metilo-metacrilato/poli-etilo-metacrilato (PMMA/PEMA) podem ser conformados a baixa pressão, na forma de cilindros carregados com *gentamycin*, e ser usados para libertar 40% do antibiótico ao longo de 70 dias. Segundo a literatura ocorre o crescimento de apatite na superfície do compósito quando este contacta com o fluido simulador do plasma humano durante o mesmo período [120]. Em estudos com o mesmo antibiótico Paul e Sharma usaram um material compósito preparado a partir de grânulos esféricos de hidroxiapatite e um sal de sódio. Os grânulos foram preparados a partir de pó de hidroxiapatite que foi forçado através de um orifício com um diâmetro compreendido entre 200 a 400 μm . Os grânulos com poros de dimensão entre 5 e 25 μm foram introduzidos numa solução de antibiótico sob vácuo, sendo a mistura evaporada e seca. Decorrida essa etapa, os grânulos com antibiótico foram misturados com o sal e prensados em pastilhas com um diâmetro de 18mm. Verificaram que a libertação da droga ocorria de uma forma muito rápida, ou seja, 30% ao fim de uma hora. Os resultados revelaram que a utilização de partículas esféricas com poros uniformes tem particular interesse pelo facto de não promoverem reacções inflamatórias [40]. Queiroz e seus colaboradores estudaram a adsorção e a libertação do antibiótico (*ampicilina*) usado no tratamento de doenças periodontais, em cilindros de hidroxiapatite e num biovidro reforçado com hidroxiapatite [123]. O compósito foi compactado e sinterizado de modo a formar-se uma nova fase cristalina, o TCP (tricálcico fosfato), nas duas formas α e β [123]. Os resultados mostraram que os cilindros de hidroxiapatite adsorviam maior quantidade de antibiótico do que o compósito biovidro/ hidroxiapatite. Este comportamento foi atribuído á presença de determinadas espécies químicas na superfície dos materiais e ao facto do compósito sinterizado apresentar TCP, fase mais solúvel do que a hidroxiapatite, que é reabsorvida no processo de adsorção. Queiroz verificou também que cinética de libertação era similar para todos os ensaios embora na hidroxiapatite o antibiótico estivesse mais fortemente adsorvido do que no compósito e por essa razão a quantidade libertada fosse menor [123]. Dos resultados até agora apresentados ressalta uma clara escassez de estudos com células e/ou *in vivo*, sendo de difícil avaliação os benefícios de um determinado SLF em detrimento de um outro. Alguns autores tentaram, de uma forma simplista, mostrar que os

seus materiais tinham boa apetência para aplicações como SLF, limitando-se nesse sentido à realização de alguns estudos *in vitro*, por forma a mapear o comportamento do material nessas condições. Sabe-se porém que no organismo existem não só células como também diversos iões e sais que podem influenciar de forma decisiva os mecanismos de libertação das substâncias bem como a degradação dos materiais.

Os resultados preliminares obtidos *in vivo* por Yamashita e seus colaboradores com um sistema de libertação produzido por compactação do antibiótico no interior de um cerâmico de hidroxiapatite (CHap) poroso revelaram-se promissores. O sistema foi testado em 18 pacientes com idades compreendidas entre os 14 e os 77 anos e os resultados mostraram que ao final de 3 meses o local infectado havia recuperado, não tendo sido detectadas infecções durante os tratamentos que variaram entre os 24 e os 75 meses. Verificou-se que o implante do CHap no organismo (osso) induziu progressos na recuperação da osteomielite em todos os pacientes e que a libertação da droga *in vivo* ocorreu durante um período longo de tempo. Para além de controlar infecções verificou-se que este sistema estimulou a osteocondutividade no interior dos poros [124].

Outros tipos de substâncias têm sido usadas como drogas modelo em estudos de tratamento do osso. Pham e seus colaboradores prepararam grânulos de hidroxiapatite por atomização conjunta de uma suspensão de partículas precipitadas e de fármaco ciprofloxacina e compactos cilíndricos obtidos por prensagem de grânulos atomizados. Verificaram que a libertação da droga *in vitro* pelos cilindros era mais lenta do que pelos agregados de partículas [125].

O azul de metileno foi usada como droga modelo por Vladimir em grânulos porosos de hidroxiapatite. Os grânulos porosos preparados por uma técnica de efeito de líquidos imiscíveis foram impregnados com a solução de fármaco em vácuo. Realizaram-se testes *in vivo* em ratos, verificando-se que após 2 horas se tinha atingido a velocidade máxima de libertação da droga [126].

O acetato de hidrocortisona foi utilizado por Krajewsky como uma droga modelo para o tratamento de doenças do osso. Impregnam-se amostras cilíndricas de hidroxiapatite e de alumina de diferentes porosidades com o acetato de hidrocortisona e os resultados obtidos mostraram que sistemas de libertação com poros finos prolongam o tempo de libertação do fármaco e possibilitam uma libertação constante. Observou-se também que a distribuição dos poros na matriz era um factor importante nos processos de libertação, sugerindo que,

para efeitos de libertação do fármaco uma distribuição bimodal de porosidade é preferível a uma unimodal [127].

A insulina, usada no tratamento das diabetes, foi também utilizada como droga modelo em estudos de libertação a partir de microesferas bioactivas de hidroxiapatite preparadas por peletização. Efectuaram-se estudos *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* permitiram verificar que, após 54 horas, as partículas tinham libertado 92% de insulina. Os resultados dos testes *in vivo* evidenciaram uma diminuição do nível de glucose no sangue ao fim de 8 horas, nível esse que posteriormente voltou a aumentar [128]. Os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram diferenças entre os comportamentos *in vivo* e *in vitro*. Segundo os autores a quantidade de insulina introduzida no cerâmico revelou-se insuficiente e o SLF só teve efeito num curto período de tempo, embora os estudos *in vitro* documentassem uma libertação durante um período mais longo de tempo. Este estudo comprova a clara necessidade de se realizarem sempre estudos *in vivo* para um teste efectivo dos SLF.

Slósarczyk preparou cilindros porosos de hidroxiapatite impregnados com pentoxifilino para estudos de libertação [10]. O controlo da porosidade das amostras foi feito com agentes formadores de poros por processos de sinterização. Verificou que a quantidade e o tempo de libertação da droga dependiam da microestrutura dos cerâmicos de hidroxiapatite, sendo a libertação controlada pela porosidade aberta dos cerâmicos [10].

O aprofundamento do conhecimento na área dos processos de formação do osso permitiu a identificação de uma nova e completa família de proteínas inibidoras, as proteínas morfogénicas do osso (BMPs), que regulam a diferenciação *in vivo* da cartilagem e do osso. O termo proteínas morfogénicas do osso (BMP) é usado para descrever as substâncias na matriz do osso desmineralizado responsáveis por esse fenómeno. A potencialidade dos BMP para aplicações médicas foi descoberta por Johnson e seus colaboradores, que purificaram parcialmente BMP humanas e as usaram com sucesso numa série de pacientes com problemas na união dos ossos longos e com defeitos nos segmentos [129]. A seguir a uma fractura, os BMP aparentemente difundem de uma matriz de osso reabsorvível e activam a células osteoprogénitas que, por sua vez, produzem mais BMP [129]. Os factores de crescimento podem ser imobilizados na superfície de um biomaterial para controlar a proliferação celular. Os factores osteogénicos mais comuns são os factores de crescimento transformadores (TGF-B), as proteínas morfogénicas do osso (BMP-2) e as proteínas osteogénicas (OP-1 ou BMP-7) [130]. Tal como todas as

proteínas, os BMP exibem tempo curto de vida sendo por isso necessárias quantidades significativas, o que dificulta o desenvolvimento de sistemas libertadores destas substâncias [131]. É sabido que a hidroxiapatite possui grande afinidade para adsorver e libertar proteínas [132].

Utilizaram-se cilindros de cimento cerâmico produzidos por mistura de β -fosfato tricálcico e de monocálcico monohidratado (β -TCP-MCPM) com rhBMP-2 no tratamento do fêmur de ratos. Observou-se que a união do cimento ao fêmur de rato ocorria ao fim de 3 semanas e que a união era consideravelmente dependente da dose de proteína usada [130].

Os materiais cerâmicos á base de fosfato de cálcio parecem ser bons transportadores de proteínas (BMP) e funcionar como sistemas de libertação lenta. Realizaram-se estudos com proteínas morfogénicas (BMP) usando como agente de libertação um vidro bioactivo, com o objectivo de caracterizar o comportamento *in vitro* do vidro de Si-Ca-P enquanto substrato para o desenvolvimento e diferenciação de células osteoprogenitoras. O resultados mostraram que o vidro carregado com BMP apresentava uma maior aptidão para a diferenciação e crescimento de células do que o vidro sem BMP [133].

Paul e Sharma produziram grânulos esféricos porosos de hidroxiapatite por peletização para serem utilizados como libertadores de proteínas [36]. Os ensaios feitos *in vitro* mostraram que as partículas preparadas são um bom meio de transporte de proteínas [36] e que a libertação da droga nestes sistemas não é controlada por mecanismos de degradação como nos sistemas poliméricos [95, 97, 134].

Matsumoto e os seus colaboradores promoveram a adsorção de proteínas (BMP) na superfície de partículas cristalinas de hidroxiapatite obtidas por síntese hidrotermal a três temperaturas diferentes (40, 60 e 80 °C) que apresentavam áreas superficiais específicas diferentes. O estudos de libertação permitiram concluir que para baixos valores de pH de solução (pH=4) a quantidade de proteínas libertada era superior à observada a valores de pH superior (pH=7) sendo também condicionada pelos processos de dissolução das partículas [135].

Kuboki e seus colaboradores realizaram alguns estudos *in vivo* com proteínas morfogénicas adsorvidas em partículas de hidroxiapatite com características diferentes: partículas densas; partículas porosas e tabletes porosas [136]. O trabalho teve por objectivo examinar a função dos BMP na indução da formação de osso e os resultados mostraram

que a existência de porosidade é vantajosa para aplicações biomédicas porque induz a vascularização, crucial para a formação do osso mediada pelas BMP [136].

Laurencin preparou um compósito de ácido poli(láctico-co-glicolídico) e hidroxiapatite em forma de discos com BMP-2 [137]. Os resultados obtidos durante a libertação *in vitro* mostraram que as proteínas se ligavam rapidamente às células e degradavam a parte polimérica do compósito [137]. Este estudo mostrou que as células tem a capacidade de crescer no compósito *in vitro* e que, quando o compósito com BMP-2 tal qual preparado é implantado *in vivo*, este consegue induzir a formação de osso [137].

Da análise de resultados reportados na literatura pode-se pois de uma forma geral, concluir que a quantidade e a velocidade de libertação do fármaco (ou outras substâncias de interesse) bem como a especificidade do local onde se pretende a libertação são aspectos fundamentais a ter em consideração no desenvolvimento de um SLF. A compreensão dos mecanismos de libertação, actualmente ainda muito incipientes aponta como indispensáveis os estudos de libertação *in vivo*.

Capítulo 2- Procedimento experimental



Fotografia de um mini
atomizador

2. Procedimento experimental

O trabalho experimental realizado compreendeu fundamentalmente as seguintes etapas: (i) a preparação de grânulos de hidroxiapatite com diferentes características, (ii) o carregamento das partículas de hidroxiapatite com o fármaco 5-Fluorouracil por dois processos distintos e (iii) a monitorização da libertação do 5-FU das partículas de hidroxiapatite. Nas secções que se seguem apresenta-se de uma forma detalhada o procedimento experimental utilizado em cada uma das etapas.

2.1.Preparação de grânulos de hidroxiapatite

A preparação dos grânulos de Hap envolveu os passos seguintes: (i) precipitação de

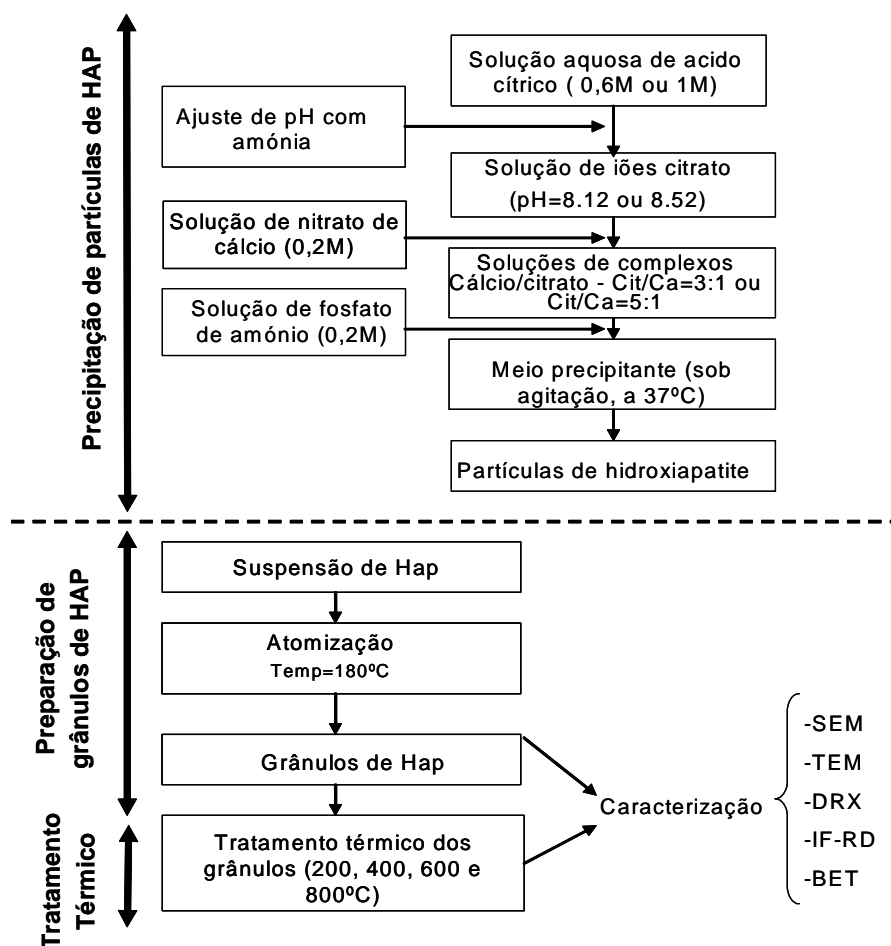


Figura 10 – Fluxograma do procedimento experimental utilizado na preparação de partículas e de grânulos de hidroxiapatite.

partículas de hidroxiapatite, (ii) atomização de suspensões aquosas das partículas precipitadas e (iii) tratamento térmico dos grânulos atomizados. O fluxograma da Figura 10, ilustra esta sequência de passos seguindo-se uma descrição pormenorizada dos mesmos.

2.1.1. Precipitação de partículas de Hap

O método de preparação de partículas de hidroxiapatite utilizado no presente trabalho foi o da precipitação em presença de citratos, reportado por M. Martins [138]. Prepararam-se soluções aquosas de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7H_2O$, Riedel-deHaën, 99.5%) 0,6M e 1M, cujo pH foi ajustado para 8,12 e para 8,52 com a adição de pequenas quantidades de uma solução de amónia a 25% (NH_4OH Riedel-deHaën). Às soluções, assim obtidas adicionou-se uma solução de hidrogenofosfato de amónio 0,2M ($(NH_4)_2HPO_4$, Merck 99%) e uma solução aquosa de nitrato de cálcio tetrahidratado 0,2M ($(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$, Riedel-deHaën, 99%). As quantidades de solução de cálcio adicionadas às soluções de pH= 8,12 e de pH=8,52 foram ajustadas por forma a que a proporção molar do citrato relativamente ao cálcio fosse de 3:1 e de 5:1, respectivamente. As soluções precursoras de Hap foram colocadas num banho termostaticado a 37°C durante 24 horas, sob agitação. Ao fim desse período de tempo, as partículas precipitadas foram separadas do meio precipitante por filtros miliporos de 45 µm e subsequentemente lavadas com água desionizada. Finalmente o material foi seco em excicador durante 24 horas.

Adoptou-se a seguinte nomenclatura para identificação das partículas precipitadas: Hap_{3:1} designa as partículas precipitadas a partir de soluções com razão citrato/ cálcio 3:1; Hap_{5:1} aplica-se às partículas obtidas de soluções com razão citrato/cálcio 5:1.

2.1.2. Preparação de grânulos de Hap por atomização

Preparam-se suspensões aquosas (~1% em peso) de HAP, com as partículas Hap_{3:1} e as Hap_{5:1}, que foram usadas como alimentação de um atomizador laboratorial Buchi-191 (Figura 11). Reportando-nos ao esquema da Figura 12, a operação de atomização pode descrever-se da seguinte forma: a suspensão é injectada e pulverizada com ar comprimido (ar de atomização) através de um bico de pressão (1) para o interior de uma câmara

aquecida (2) pela circulação de uma corrente de ar quente (ar de secagem). A pulverização



Figura 11- Fotografia do atomizador laboratorial utilizado

da suspensão divide-a em finas gotículas que, em contacto com o ar quente circulante (a cerca de 180°C), se transformam em grânulos secos por evaporação da água. Estes grânulos são arrastados pela corrente de ar até ao ciclone (3) e por gravidade sedimentam no recipiente de recolha (4). Os grânulos atomizados a partir das suspensões de partículas Hap_{3:1} e Hap_{5:1} foram identificados como Gra_{3:1} e Gra_{5:1}, respectivamente.

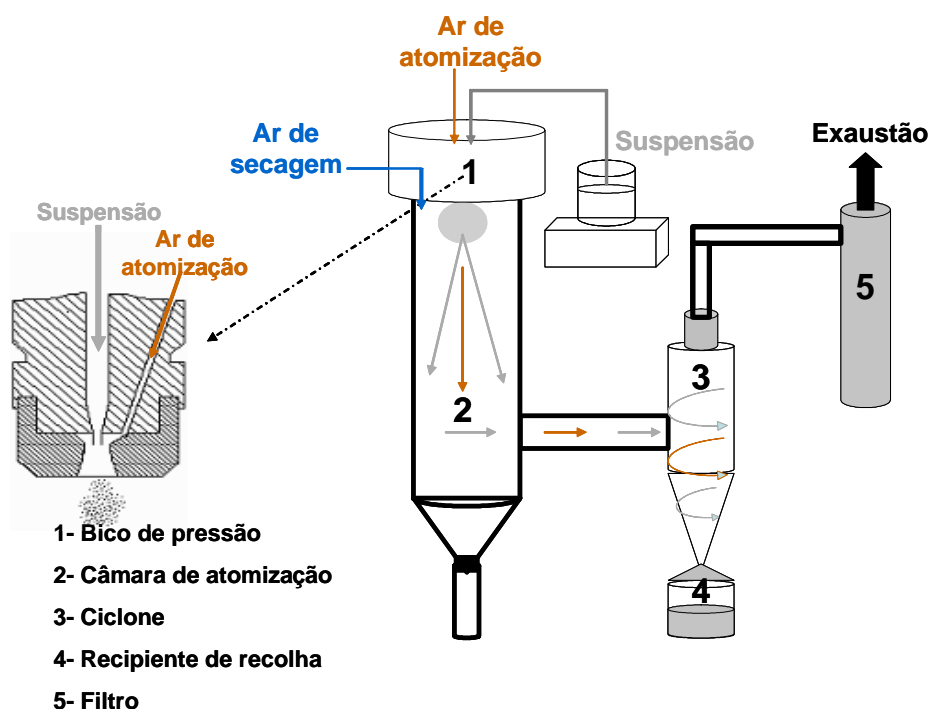


Figura 12- Ilustração esquemática do atomizador laboratorial Buchi-191

2.1.3. Tratamento térmico dos grânulos

Os grânulos Gra_{3:1} e Gra_{5:1}, foram sujeitas a tratamentos térmicos num forno de câmara, com atmosfera de ar. Os tratamentos térmicos foram realizados às temperaturas de 200, 400, 600 e 800°C durante 2 horas, usando-se uma taxa de aquecimento e de arrefecimento de 10°/min. As partículas Gra_{3:1} e Gra_{5:1} tratadas termicamente foram identificadas como GraT_{3:1} e GraT_{5:1} respectivamente.

2.2. Carregamento dos grânulos de Hap com o fármaco 5-Flourouracil

No presente trabalho, procedeu-se ao carregamento dos grânulos de HAP preparados por atomização com o fármaco 5-Flourouracil (5-FU; Sigma 99%), com o objectivo de utilizá-los como transportadores do fármaco. Para efeitos de elucidação dos processos de adsorção do fármaco, utilizaram-se também partículas comerciais de hidroxiapatite (Fluka, ultra pura) como material adsorvente do fármaco.

Usaram-se dois procedimentos distintos para carregar os grânulos com fármaco: (1) a atomização de uma suspensão de partículas em solução de fármaco e (2) a imersão das partículas em solução de fármaco. O procedimento (1) pode ser descrito da seguinte forma: preparou-se uma solução aquosa de 5-FU (250mg/L) e adicionou-se ~1% (peso) de partículas de Hap_{3:1}. Seguidamente a suspensão foi atomizada num atomizador laboratorial (Buchi-191). O procedimento (2) pode ser detalhado da seguinte forma: adicionou-se uma determinada quantidade de grânulos de Hap à solução de fármaco (5-FU) e deixou-se a suspensão obtida em repouso durante 7 dias. O procedimento (2) foi também o utilizado para carregar as partículas comerciais de Hap, sendo neste caso o tempo de imersão das partículas na solução de 5-FU de 1 dia. No decurso do carregamento, e após períodos de tempo predefinidos, removeram-se pequenas quantidades de solução e monitorizou-se a quantidade de 5-FU adsorvido pelos grânulos e partículas por análise da concentração de 5-FU na solução. Para tal utilizou-se um espectrofotómetro de UV, seleccionando-se o comprimento de onda correspondente à absorvância máxima do 5-FU (265,5 nm). Após o carregamento, as partículas foram filtradas em filtros miliporos de 45µm e colocadas em excicador durante 24 horas.

As soluções de fármaco 5-FU usadas no presente estudo foram preparadas de diferentes modos com o objectivo de avaliar o efeito de alguns parâmetros da solução de fármaco nos processos de adsorção. Com esse intuito prepararam-se soluções aquosas simples de 5-FU e soluções de 5-FU tamponizadas com fosfato a dois valores diferentes de pH. Prepararam-se também soluções com diferentes concentrações de fármaco. Seguidamente descreve-se detalhadamente a preparação de cada uma destas soluções:

Soluções aquosas simples de 5-FU

Preparou-se uma solução aquosa de 5-FU por dissolução de 25 mg de 5-Fluorouracil em 100 ml de água desionizada.

Para estudar o efeito da variação da concentração do 5-FU em solução no processo de adsorção preparam-se soluções aquosas simples de 5-FU com as seguintes concentrações: 250 mg/L, 500 mg/L, 1,5g/L, 5g/L e 10g/L.

Soluções de 5-FU tamponizadas a pH=7,4

Colocaram-se em agitação permanente 405 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 99.5%) (0,2 M) e adicionaram-se 95 ml da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba 99%) (0,2 M) e água desionizada de modo a perfazer o volume total 1000 ml. À solução resultante adicionou-se 250 mg de 5-FU.

Soluções de 5-FU tamponizadas a pH=5.6

Colocaram-se 40 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 M) em agitação permanente e adicionaram-se 460 ml da solução $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,2 M). Por fim foi adicionada água desionizada até se atingir o volume final de 1000 ml. À solução resultante adicionou-se 250 mg de 5-FU.

No sentido de se estudar o efeito da presença de citratos nas partículas de Hap precipitadas e atomizadas nos processos de adsorção do 5-FU, fizeram-se pré-tratamentos de superfície de algumas partículas (partículas comerciais) com ácido cítrico. Para tal preparou-se uma solução aquosa de ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Riedel-deHaën, 99.5%) 0,6M. O pH da solução de ácido cítrico a 25°C foi ajustado para 8,12 com a adição de pequenas quantidades de uma solução de amónia NH_4OH (Riedel-deHaën 25%). Adicionou-se 1 grama de partículas comerciais de Hap á solução de iões citrato. As

suspensões foram mantidas num banho termostatzado a 37°C durante 24 horas. Após este período, as partículas foram filtradas em filtros miliporos de 45µm, lavadas com água desionizada e secas em exicador durante 24 horas.

2.3.Libertação de 5-Flourouracil de partículas de Hap

No presente trabalho conduziu-se a libertação do fármaco 5-Fluorouracil dos grânulos e das partículas comerciais de Hap em soluções tamponizadas com fosfato, a pH e temperatura fisiológica, ou seja 7.4 e 37°C, respectivamente. O procedimento experimental utilizado foi o seguinte: adicionou-se uma quantidade de grânulos ou partículas de Hap a uma solução tampão (de fosfatos) com pH 7.4 e deixou-se a suspensão em agitação num banho termostatzado a 37°C durante um dia (no caso das partículas comerciais) ou durante 7 dias (no caso dos grânulos). No decurso da libertação e após períodos de tempo predefinidos removeram-se pequenas quantidades de solução. Monitorizou-se a quantidade de 5-FU libertado pelas partículas através da análise da concentração de 5-FU dessas amostras de solução. Para esse estudo utilizou-se um espectrofotómetro de UV, seleccionando o comprimento de onda de absorvância máxima do 5-FU (265.5nm).

Monitorizou-se também a variação da concentração de cálcio e de fósforo na solução de libertação. Para a detecção do cálcio e do fósforo recorreu-se à técnica de espectroscopia de plasma de acoplamento indutivo. As soluções tampão de fosfatos usadas no presente estudo foram preparadas de forma a avaliar-se a influência do sal NaCl nos processos de libertação do 5-FU dos grânulos. Com esse intuito prepararam-se soluções tampão de fosfatos simples e soluções com uma concentração de NaCl de 0,145M. Seguidamente detalha-se a preparação de cada uma das soluções:

Solução tampão de fosfatos simples a pH 7,4

Colocaram-se em agitação permanente 405 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 M) e adicionaram-se 95 ml da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,2 M) e água desionizada de modo a perfazer o volume total 1000 ml.

Solução tampão de fosfatos com NaCl a pH 7,4

Colocaram-se em agitação permanente 405 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 M) e adicionaram-se 95 ml da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,2 M) e água desionizada de modo a perfazer o volume total 1000 ml. À solução resultante adicionou-se 100 ml de uma solução 154 mM de NaCl (Merck 99.5%).

2.4.Caracterização dos materiais

A morfologia das partículas e grânulos de Hap (partículas comerciais, partículas precipitadas, grânulos e grânulos tratados termicamente) usadas no presente trabalho foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) (Hitachi S-4100). As amostras para SEM prepararam-se usando suspensões das diferentes partículas em etanol. Colocaram-se gotículas de suspensão sobre lamelas de vidro que depois de secas se recobriram com ouro. A morfologia das partículas $\text{Hap}_{3:1}$ e dos grânulos calcinados a 800°C , foi caracterizada por microscopia electrónica de transmissão (TEM) Hitachi H-9000-NA, usando 300 kV como potencial de aceleração. Neste caso as amostras prepararam-se da seguinte forma: grânulos porosos tratados termicamente a 800°C foram dispersos numa solução de 2-propanol e posteriormente colocados sobre uma grelha de cobre. Identificaram-se as fases cristalinas das diferentes partículas por difracção de raios-X, utilizando um difractómetro Rigaku PMG-VH, com radiação $\text{CuK}\alpha=1,5405\text{\AA}$. Caracterizou-se o tamanho e a distribuição granulométrica dos grânulos $\text{Gra}_{3:1}$ e $\text{Gra}_{5:1}$ usando um equipamento de análise de partículas Coulter Fluid Module (LS). Utilizou-se a espectroscopia de infravermelho (espectrofotómetro Mattson galaxy 3020) em modo de transmitância, de 400 a 4000 cm^{-1} e a espectroscopia de Raman em modo de absorvância de 0 a 4000 cm^{-1} para identificar os grupos funcionais das diferentes partículas. A área superficial específica (As) das partículas foi determinada por adsorção de gás (azoto) num equipamento Micromeritics- Gemini 2370 V5, com base na isotérmica de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Para o estudo do comportamento térmico das partículas utilizou-se um equipamento Setaram Labsys 1600, para seguir o comportamento termogravimétrico e termo-diferencial (TG-ATD) das partículas, durante o aquecimento desde a temperatura ambiente até 1200°C , à taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Determinou-se a mobilidade electroforética das partículas usando um equipamento Coulter Delsa 440SX a 25°C . As amostras foram

preparadas da seguinte forma: suspendeu-se uma pequena quantidade de partículas numa solução de KCl (5×10^{-3} M), para estabilizar a dupla camada eléctrica das partículas. Para garantir a estabilização da suspensão, a amostra foi deixada em repouso durante duas horas antes da realização das medidas.

Para a quantificação do fármaco 5-Fluorouracil em solução usou-se um espectrofotómetro de UV Shimadzu UV-2101/3101 PC. Por forma a estabelecer a correspondência entre a absorvância UV do 5-Fluorouracil, ao comprimento de onda de 265.5 nm, e a concentração do 5-FU em solução, foi traçada uma curva de calibração usando soluções aquosas de 5-FU de concentração conhecida. Todas as soluções usadas para o traçado da curva de calibração foram preparadas com água desionizada, verificando-se que o sistema obedecia à lei de Beer.

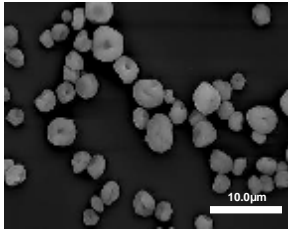
A quantidade de 5-FU adsorvida pelas partículas de hidroxiapatite foi determinada de acordo com a seguinte relação:

$$Q = (V(\Delta C)/W)/A_s \quad (\text{Eq. 17})$$

Sendo Q (mg de 5-FU/m² de área específica) a quantidade de 5-FU adsorvida, V(l) o volume da solução que está em contacto com a massa de partículas de hidroxiapatite W(g), A_s (m²/g) área superficial específica, ΔC (mg de 5-FU/L de solução) a diferença entre a concentração inicial (C_0) e a concentração final (C_e) de 5-FU na solução [54].

A variação da concentração do cálcio e do fósforo nas soluções de 5-FU foi avaliada por espectroscopia de plasma de acoplamento indutivo (ICP) usando o aparelho da marca ISA *Jobin Yvon-JY70 Plus*.

Capítulo 3 – Resultados e discussão



Grânulos de hidroxiapatite
porosos

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização dos materiais utilizados como suporte de fármaco

O objectivo do presente capítulo é caracterizar os materiais que serão utilizados como suporte de fármaco. A matéria-prima utilizada na preparação dos referidos materiais compreende não só pós de hidroxiapatite comerciais mas também pós obtidos por precipitação. Estes foram preparados pelo método desenvolvido por M. Martins [138], que estudou a preparação de partículas de hidroxiapatite em presença de citratos, nomeadamente os efeitos do pH e da concentração de citrato nas características das partículas precipitadas. Seguidamente apresentam-se e discutem-se os resultados de caracterização das partículas precipitadas, dos grânulos obtidos por atomização destas, antes e após tratamento térmico, e das partículas de hidroxiapatite comerciais.

3.1.1. Características das partículas comerciais de Hap

No presente estudo utilizaram-se partículas comerciais de hidroxiapatite (Hap), provenientes do fornecedor Fluka do lote 55496 com ultra pureza. Na Figura 13 está

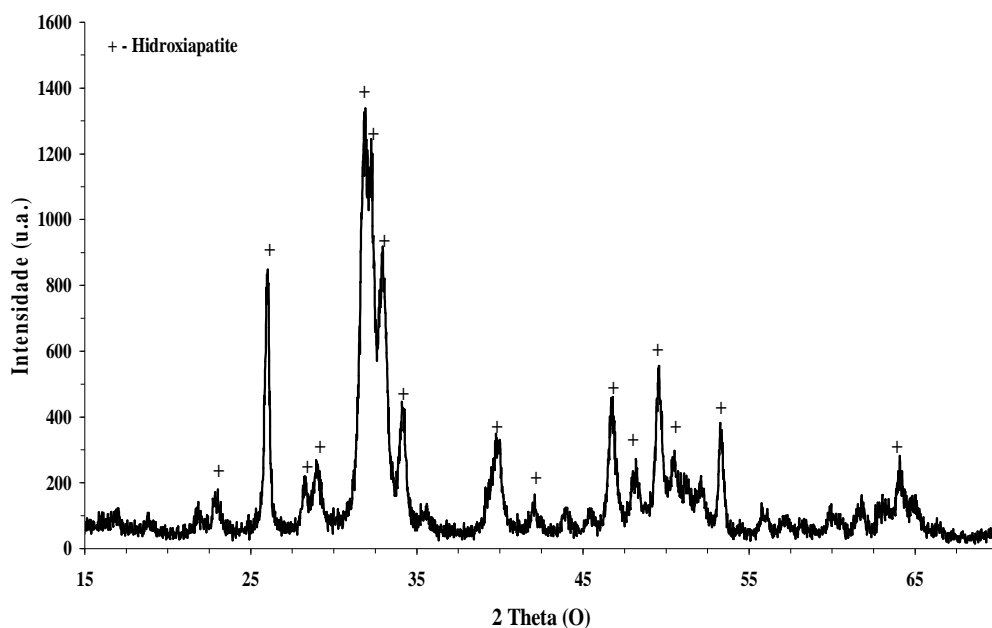


Figura 13- Difractograma de raios X das partículas comerciais

representado o difractograma destas partículas que revela a presença de uma única fase cristalina identificada como hidroxiapatite. A morfologia das partículas ilustrada na Figura 14a, revela que as partículas comerciais têm a aparência de placas finas micrométricas constituídas por subunidades de menor dimensão (Figura 14b). As medidas de área superficial específica destas partículas revelam um valor de $30 \text{ m}^2/\text{g}$.

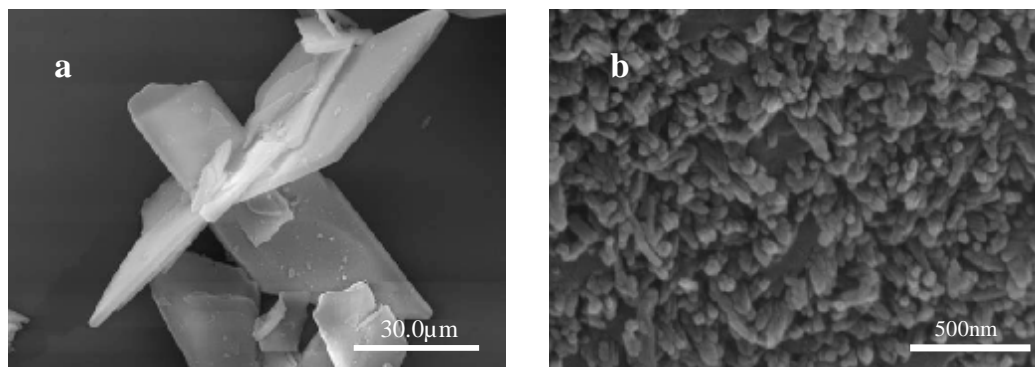


Figura 14- (a, b) Micrografias de SEM das partículas comerciais na forma original

O espectro de infravermelho das partículas (Figura 15), confirmou a presença de grupos funcionais característicos da hidroxiapatite [139]. As bandas a 472 , 575 , 601 , 962 , 1072 - 1032 e 1087 cm^{-1} denunciam os modos de vibração correspondentes ao grupo (PO_4^{3-}) presentes nas partículas [139]. O primeiro pico a 1087 cm^{-1} corresponde ao modo

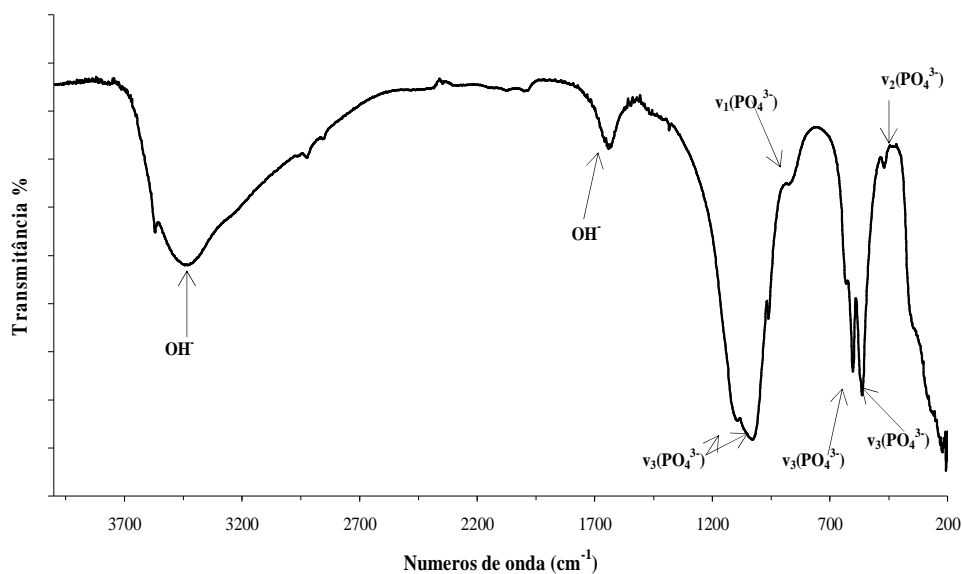


Figura 15- Espectro de FTIR das partículas comerciais

triplamente degenerado de elongação assimétrico do PO_4 enquanto as outras duas componentes deste modo degenerado, ν_3 , da ligação P-O do grupo fosfato aparecem a 1046 e a 1032 cm^{-1} . O pico a 962 cm^{-1} pode ser atribuído a um modo de vibração simétrico não degenerativo ν_1 , das ligações P-O dos grupos fosfatos [18, 139]. As bandas observadas a 601, 575 e 561 cm^{-1} podem ser associadas a uma ligação de deformação triplamente degenerada, ν_4 das ligações O-P-O e são reveladoras da cristalinidade das partículas [140]. A fraca transmitância a 472 cm^{-1} está relacionada com uma componente do modo de ligação de deformação dupla degenerada, ν_2 , do grupo fosfato PO_4 . Além dos picos referidos, observa-se ainda uma banda larga entre 3700 e 3200 cm^{-1} associada à vibração dos grupos hidroxilos e uma a 1630 cm^{-1} , relacionada com a deformação de H-O-H [18, 139]. A banda a 2349 cm^{-1} deve-se ao CO_2 atmosférico [18].

A análise da Figura 16 mostra que o espectro de Raman das partículas comerciais evidencia os picos característicos da hidroxiapatite [139]: é visível a existência de uma banda a 962 cm^{-1} correspondente à vibração ν_1 dos grupos tetraédricos PO_4 , e são também observadas bandas reveladoras de outras vibrações do grupo PO_4 . Uma dessas bandas correspondente à vibração triplamente assimétrica degenerada (ν_3) do grupo PO_4 (da ligação P-O) é observada a 1045 cm^{-1} , e outra, a 590 cm^{-1} corresponde ao modo de vibração ν_4 dos grupos PO_4 (da ligação O-P-O). Observa-se ainda uma outra a 430 cm^{-1} , de

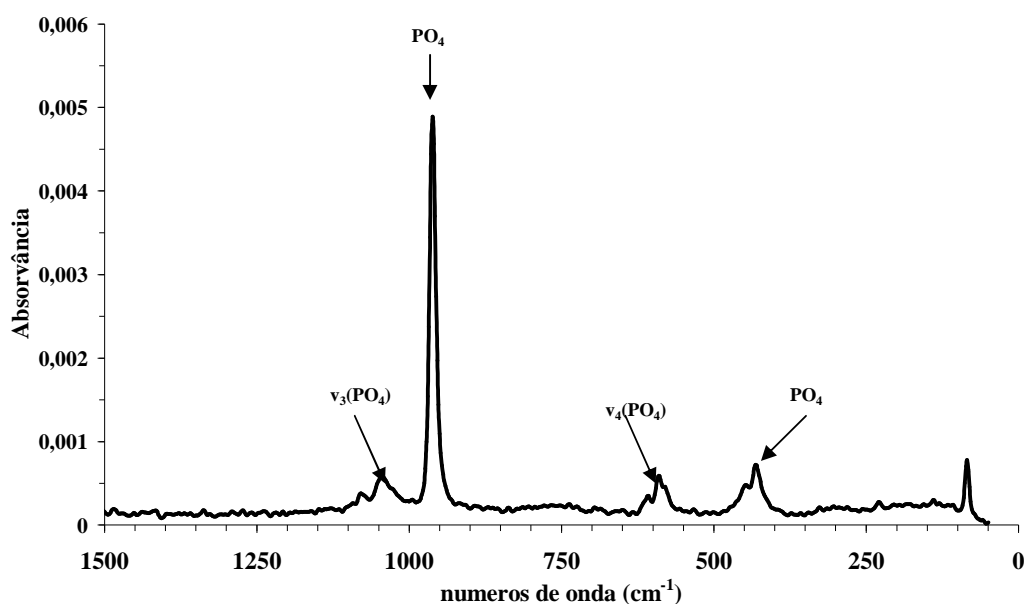


Figura 16- Espectro de Raman das partículas comerciais

fraca intensidade, que corresponde à vibração dupla dos grupos PO₄ (da ligação O-P-O) [139, 140].

3.1.2. Características das partículas precipitadas

Na tabela 3 discriminam-se as condições experimentais de precipitação usadas no presente trabalho e a nomenclatura das partículas obtidas, bem como as características mais relevantes das mesmas.

Tabela 3- Condições experimentais de precipitação e características das partículas de Hap obtidas

| Condições de precipitação | | | Características das partículas precipitadas | | | |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|---|----------------------|-------------------------|
| pH do meio precipitante | Razão [citrato]/[cálcio] Cit/ca | Nomenclatura da partícula precipitada | Cristalinidade | Área superficial específica (m ² /g) | Forma das partículas | Dimensão das partículas |
| 8,12 | 3:1 | Hap _{3:1} | Pouco cristalina | 170 | Agulhas finas | Nanométrica |
| 8,52 | 5:1 | Hap _{5:1} | Pouco Cristalina | 98 | Bastonetes | Micrométrica |

As partículas obtidas no meio precipitante com menor teor de citrato, isto é as partículas Hap_{3:1}, foram caracterizadas por difração de raios X (Figura 17-a) tendo-se confirmado

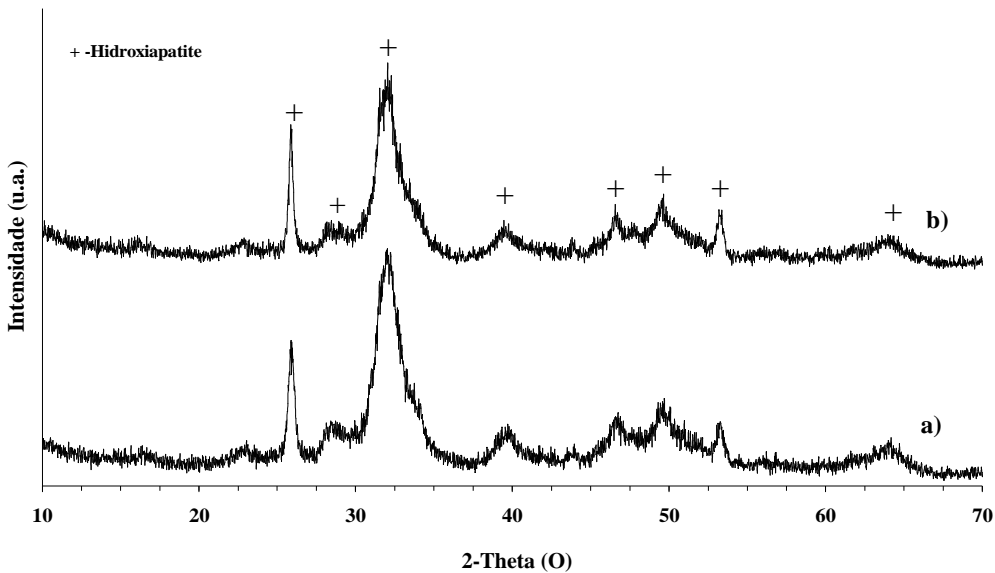


Figura 17- Difractograma de RX das partículas precipitadas a partir de soluções com razões citrato/cálcio 3:1 (a) e 5:1 (b)

tratar-se de partículas de Hap, pouco cristalinas [138]. A técnica de difracção de electrões revelou também anéis de Bragg difusos (Figura 18-b), característicos de estruturas pouco cristalinas, o que veio confirmar as indicações de baixa cristalinidade do DRX.

As características morfológicas das partículas $\text{Hap}_{3:1}$ estão documentadas na Figura 18-a. Observa-se que a forma destas partículas é semelhante à de pequenas e finas agulhas, com um comprimento de cerca de 100 nm. A semelhança de morfologia e de razão Ca/P que estas partículas evidenciam com as preparadas por S. Raynaud [141], ou seja, a sua forma alongada com uma dimensão longitudinal dominante parece indicar uma direcção de crescimento preferencial segundo o eixo dos c.

As medidas de área superficial específica (BET) das partículas $\text{Hap}_{3:1}$ revelaram um elevado valor de área superficial específica, $170\text{m}^2/\text{g}$, o que se coaduna com o tamanho nanométrico destas partículas.

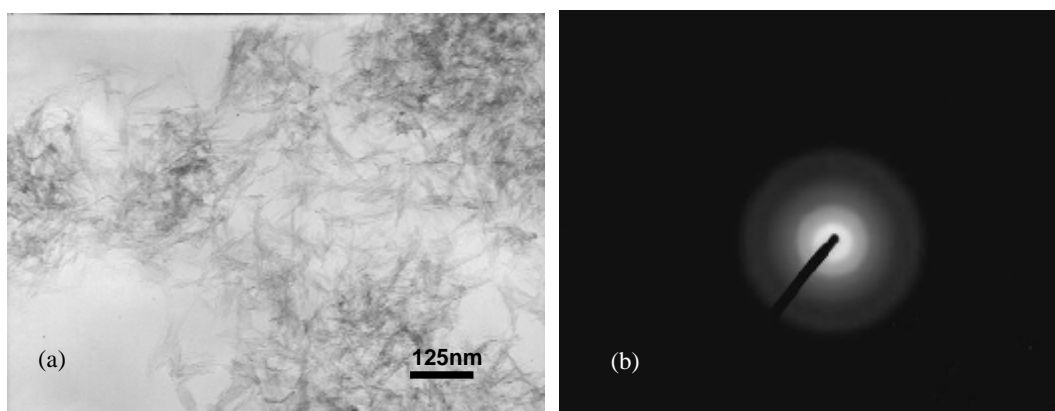


Figura 18- a) Micrografia de TEM das partículas precipitadas $\text{Hap}_{3:1}$; b) Diagrama de difracção de electrões das mesmas partículas.

As partículas precipitadas $\text{Hap}_{5:1}$, também caracterizadas por DRX como Hap pouco cristalina (Figura 17-b), apresentam uma morfologia diferente, ilustrada na Figura 19. Cada partícula parece resultar de uma associação de unidades mais elementares sob a forma de um feixe. O comprimento médio de cada partícula ronda $\sim 1\mu\text{m}$ e o seu diâmetro $\sim 500\text{ nm}$. Estes resultados confirmam as conclusões do estudo de M. Martins [138] segundo as quais a concentração de citrato e o pH são duas variáveis determinantes da morfologia das partículas precipitadas de Hap. A razão molar Ca/P dos dois tipos de partículas apresentam valores muito semelhantes, 1.68 no caso das partículas $\text{Hap}_{3:1}$ e 1.62 no caso das partículas $\text{Hap}_{5:1}$. Uma razão molar de Ca/P inferior a 1.67, valor este característico de uma

hidroxiapatite estequiométrica, indica tratar-se de uma hidroxiapatite deficiente em cálcio [139, 142] ou a presença de algum fosfato de cálcio amorfo [14].

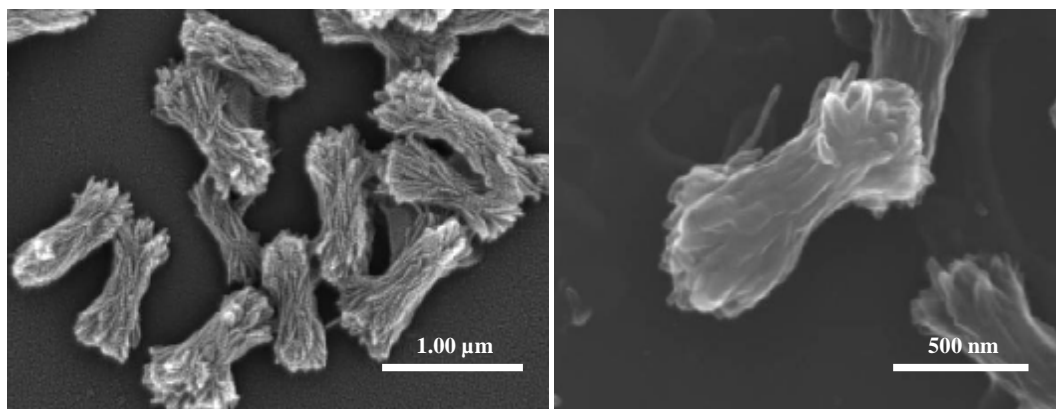


Figura 19- Micrografias de SEM das partículas precipitadas em solução com razão citrato/cálcio 5:1

Os espectros de FTIR das partículas precipitadas, apresentados na Figura 20, são consistentes com os reportados para a hidroxiapatite sintetizada por outros métodos [38]. A análise da Figura 20 mostra que os espectros dos dois tipos de partículas são muito semelhantes entre si, revelando para além dos picos característicos da hidroxiapatite [19] a existência de grupos citratos (COO^-) a 1421 e 1598 cm^{-1} . A maioria dos picos

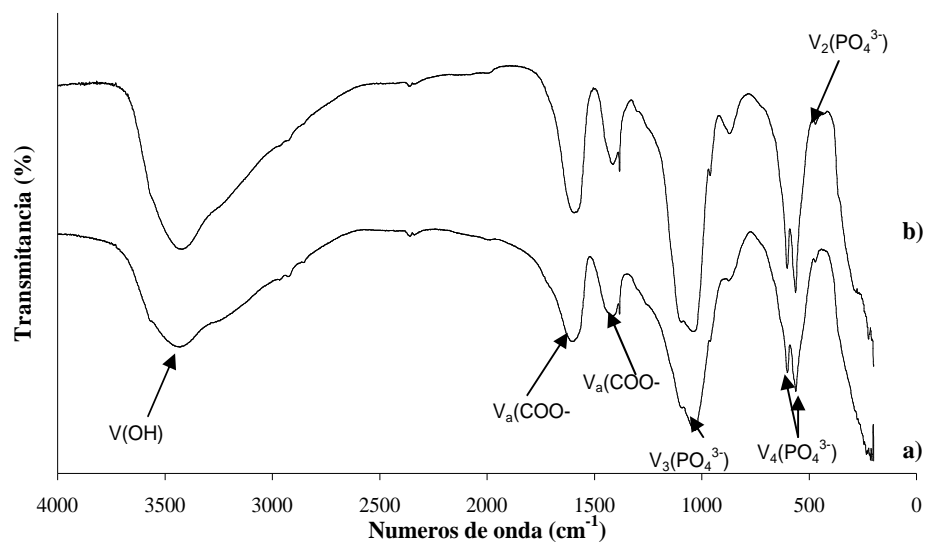


Figura 20- Espectro de FT-IR de a) partículas precipitadas com razão citrato/cálcio 3:1 e b) razão 5:1.

característicos da hidroxiapatite é fundamentalmente atribuída à vibração de dois grupos: (1) o grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$ cuja vibração é detectada a 563, 602, 961 e 1034 cm^{-1} e (2) o grupo OH^- responsável por uma banda larga que ocorre a 3443 cm^{-1} , atribuída à ligação H-O-H [139]. Nos espectros de FTIR é também observada uma banda a 3200 cm^{-1} que se atribui ao grupo NH_4^+ [141].

3.2. Características dos grânulos obtidos por atomização

A Figura 21 mostra a morfologia das partículas obtidas por atomização de suspensões das partículas de Hap precipitadas nas condições anteriormente referidas, isto é, a partir de soluções com $\text{cit}/\text{ca}=3:1$ e com $\text{cit}/\text{ca}=5:1$. Observa-se que a atomização da suspensão de partículas $\text{Hap}_{3:1}$ produz grânulos, aqui designados por $\text{Gra}_{3:1}$, com morfologia de donuts ao passo que, no caso das $\text{Hap}_{5:1}$, se obtêm grânulos (designados por $\text{Gra}_{5:1}$) com forma esférica e acentuada rugosidade superficial. Partículas com morfologia análoga de donuts e obtidas por atomização foram também reportadas por P.Luo [143].

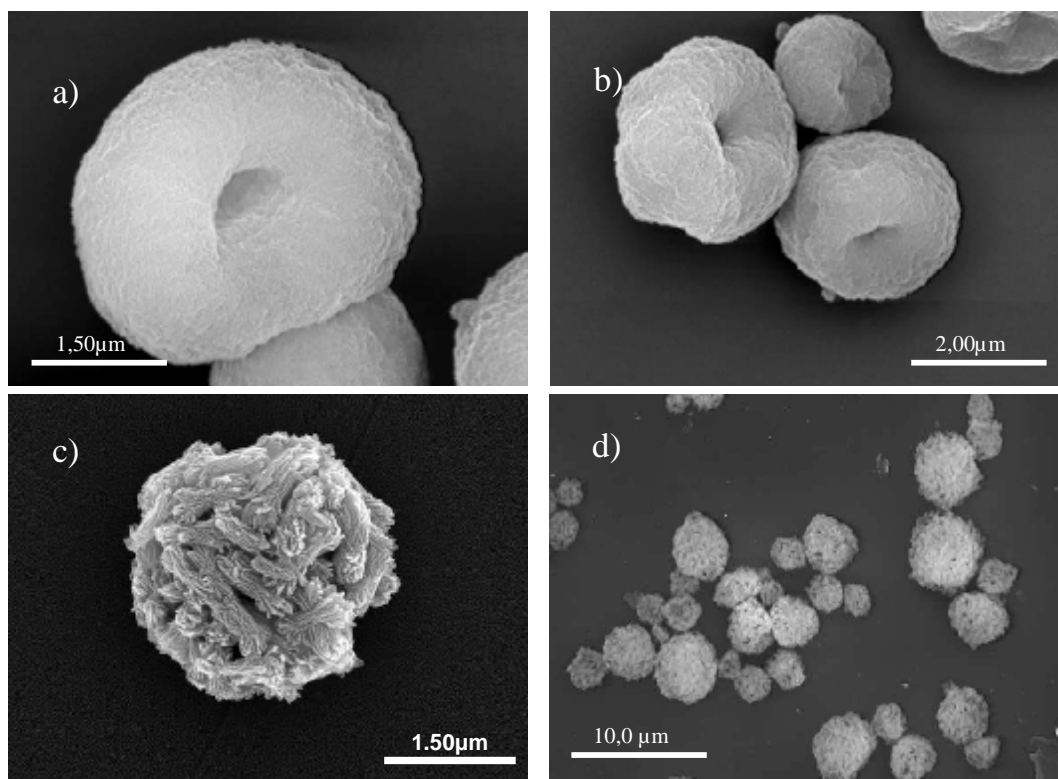


Figura 21- Micrografias de SEM dos grânulos obtidos por atomização de suspensões de partículas $\text{Hap}_{3:1}$ (a e b); e de partículas $\text{Hap}_{5:1}$ (c e d)

As análises granulométricas dos grânulos Gra_{3:1} e Gra_{5:1} são apresentadas nas Figura 22-a e b, respectivamente. A distribuição do tamanho de partícula nos dois casos é semelhante: no caso dos Gra_{3:1}, 90 % (em volume) das partículas apresenta tamanho inferior a 6 μm , situando-se o tamanho médio de partícula em 5 μm ; no caso dos Gra_{5:1}, 90% das partículas apresenta um tamanho inferior a 7 μm e o seu diâmetro médio é de cerca de 5 μm também.

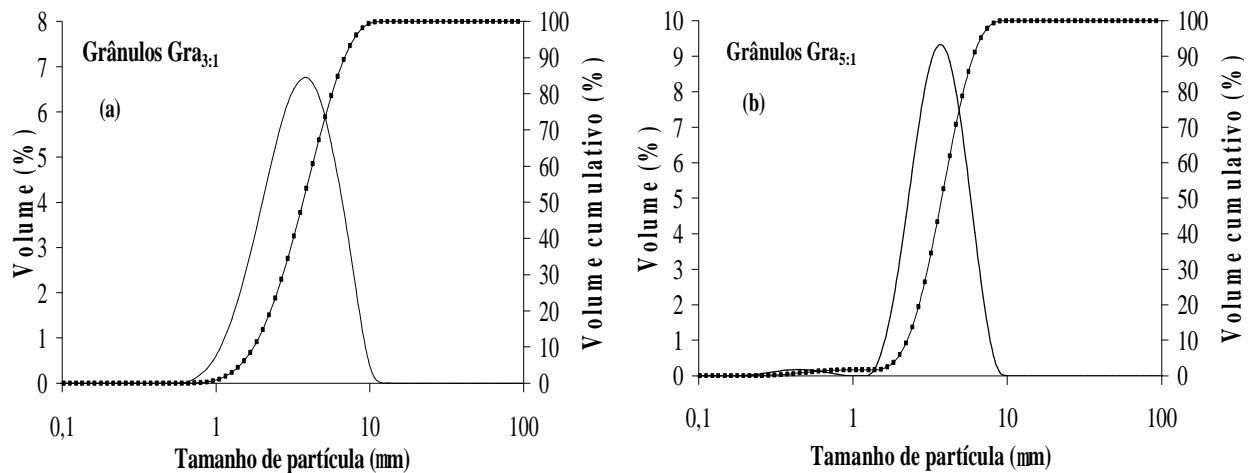


Figura 22- Análises granulométricas dos grânulos Gra_{3:1} (a) e Gra_{5:1} (b);

Os grânulos Gra_{3:1} apresentam um valor de área superficial específica de $150\text{m}^2/\text{g}$ que é significativamente superior ao das Gra_{5:1} que é $80\text{m}^2/\text{g}$. Estes valores de área superficial específica estão próximos daqueles que as partículas precipitadas (Hap_{3:1} e Hap_{5:1} respectivamente) apresentam antes de serem atomizadas, indicando que os grânulos obtidos por atomização resultaram da agregação das partículas originais (precipitadas) sem perda significativa de área superficial.

Tal como já anteriormente reportado [138] os resultados de difracção de RX dos grânulos, quando comparados com os das correspondentes partículas precipitadas, não evidenciam alterações significativas de cristalinidade, motivadas pelo processo de atomização (Figura 23). No entanto, os resultados de estudos de TEM apresentados na Figura 24 apontam para um ligeiro aumento da cristalinidade dos grânulos relativamente às partículas precipitadas Hap_{3:1} atendendo a que no espectro de difracção de electrões se observam pontos claros sobre os anéis de Bragg.

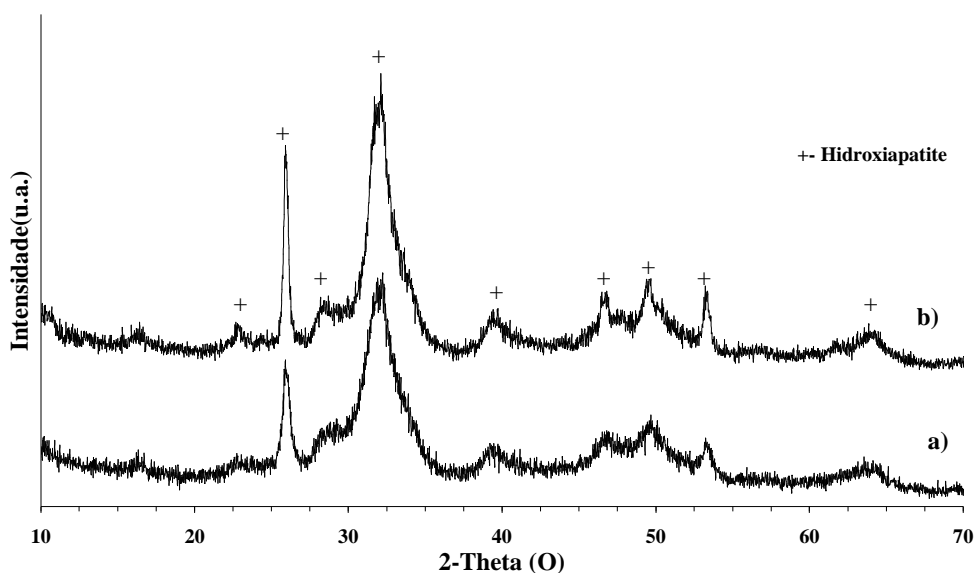


Figura 23- Difractograma de RX para as partículas Gra_{3:1} (a) e Gra_{5:1} (b)



Figura 24- Difraccção de electrões das partículas Gra_{3:1}

Os espectros de FTIR dos grânulos Gra_{3:1} e Gra_{5:1} (Figura 25) não apresentam grandes alterações relativamente aos das partículas precursoras precipitadas. A intensidade da banda atribuída ao grupo NH_3 diminui, mas as restantes bandas características das partículas fosfo-cálcicas continuam presentes.

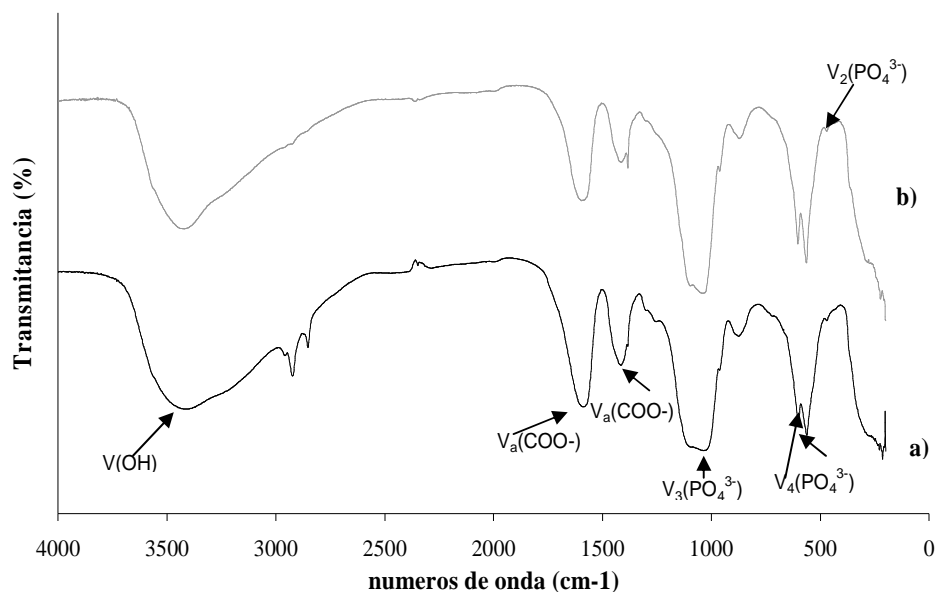


Figura 25- Espectros de FTIR dos grânulos Gra_{3:1} (a) e Gra_{5:1} (b)

3.3.Características dos grânulos tratados termicamente

A caracterização morfológica dos grânulos Gra_{3:1} e Gra_{5:1} tratados termicamente a 200, 400, 600 e 800°C revelou que as alterações de morfologia dos grânulos se apresentam particularmente significativas quando a temperatura de tratamento excede os 600°C, tal como a Figura 26 documenta. De facto, as micrografias dos grânulos tratados a 800°C mostram que os grânulos Gra_{3:1} já perderam a forma de donuts e se apresentam mais arredondados, com uma microestrutura caracterizada por grãos de contornos bem definidos, arredondados e com um diâmetro médio aproximado de 0,5µm; os grãos constituintes dos grânulos Gra_{5:1} são mais alongados e parecem resultar da densificação de cada feixe de unidades elementares. As alterações de microestrutura com o aumento da temperatura são também reveladas pelas variações de área superficial (Figura 27). Observa-se que os grânulos Gra_{3:1} de área superficial mais elevada e por conseguinte com energia de superfície mais elevada, são os que apresentam uma variação mais acentuada de área com a temperatura ($\Delta A_s/\Delta T$). Estes resultados apontam para a ocorrência de processos de densificação dos grânulos que, a temperaturas superiores a 600°C, conduzem a alterações expressivas da morfologia e microestrutura como já se referiu.

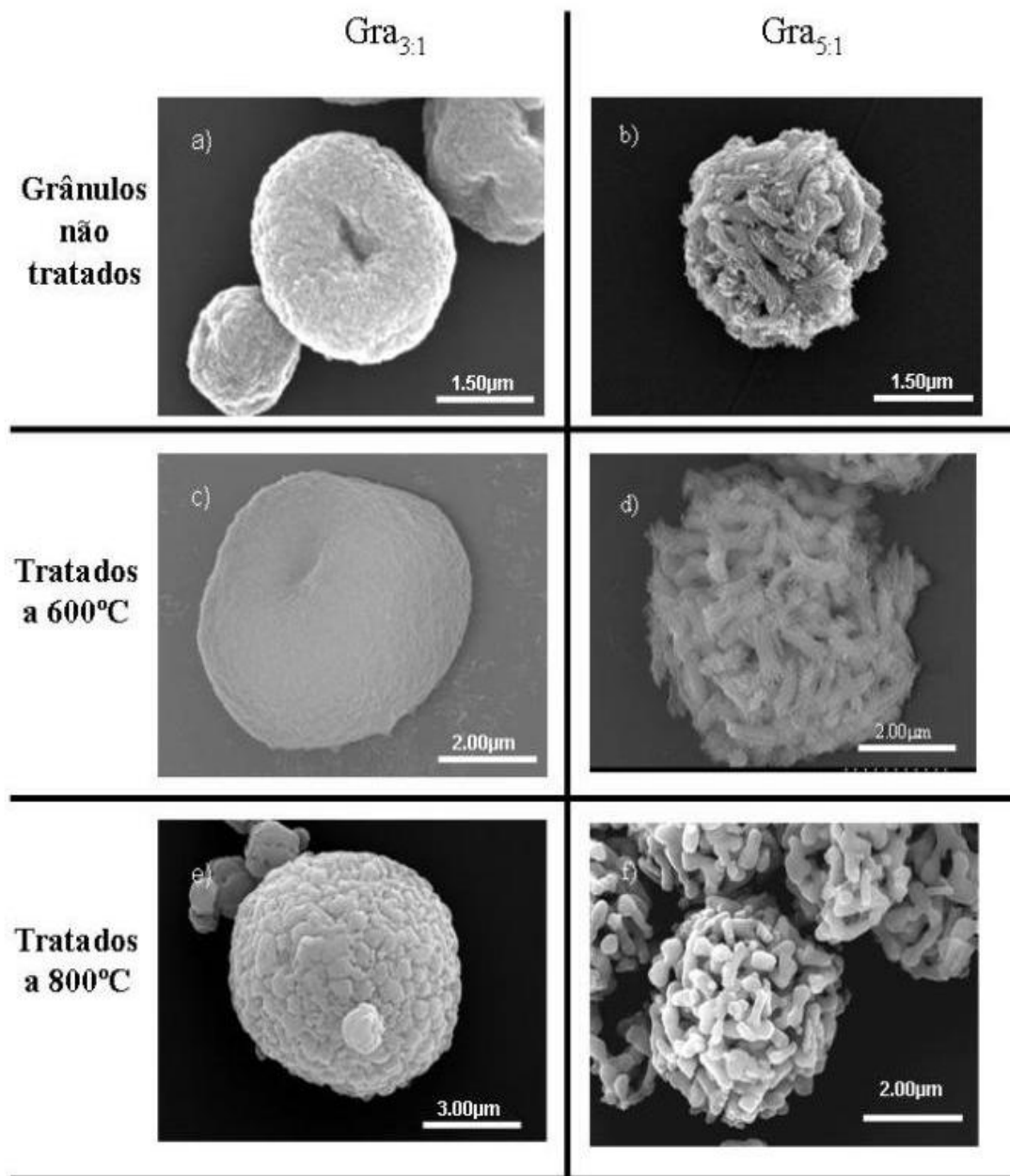


Figura 26- Micrografias de SEM dos grânulos Gra_{3:1} e Gra_{5:1}: antes do tratamento térmico (a, b); tratados a 600°C (c, d) e tratados a 800°C (e, f).

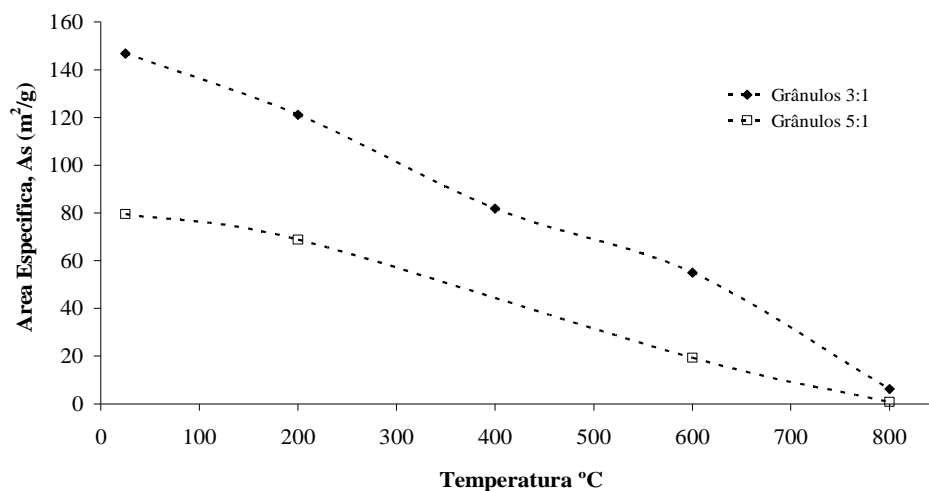


Figura 27- Variação da área superficial específica dos grânulos Gra_{3:1} (▲) e Gra_{5:1} (□) tratadas termicamente a diferentes temperaturas

Na Figura 28 apresentam-se as curvas de análise térmica diferencial (ATD) e análise termogravimétrica (ATG) que tipificam o comportamento térmico dos grânulos. Após um primeiro acidente endotérmico centrado a 100°C e acompanhado de perda de peso segue-se, a partir dos 200°C até próximo dos 400°C, um largo desvio exotérmico também acompanhado de perda de massa. O pico endotérmico é atribuído à saída de água adsorvida, seguindo-se lhe o efeito exotérmico que se atribui à decomposição dos citratos adsorvidos. Esta interpretação é também suportada pelos espectros de FTIR dos grânulos

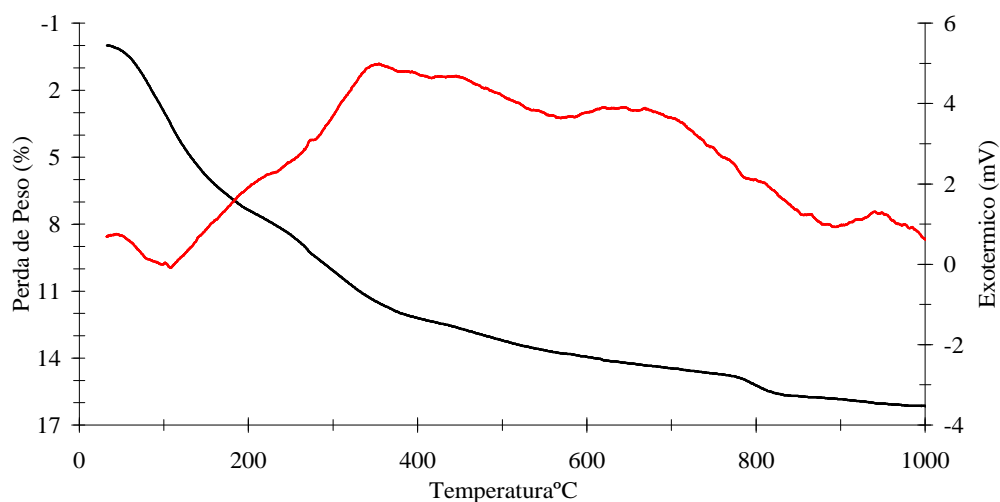


Figura 28- ATD/ATG dos grânulos porosos Gra_{5:1}

tratados termicamente (Figura 29). Estes espectros permitem constatar que a intensidade das bandas correspondentes aos grupos carboxilos (COO^-), observados a 1421 e 1598 cm^{-1} diminuem. Sugere-se pois que estes grupos carboxilos resultam da decomposição de citratos.

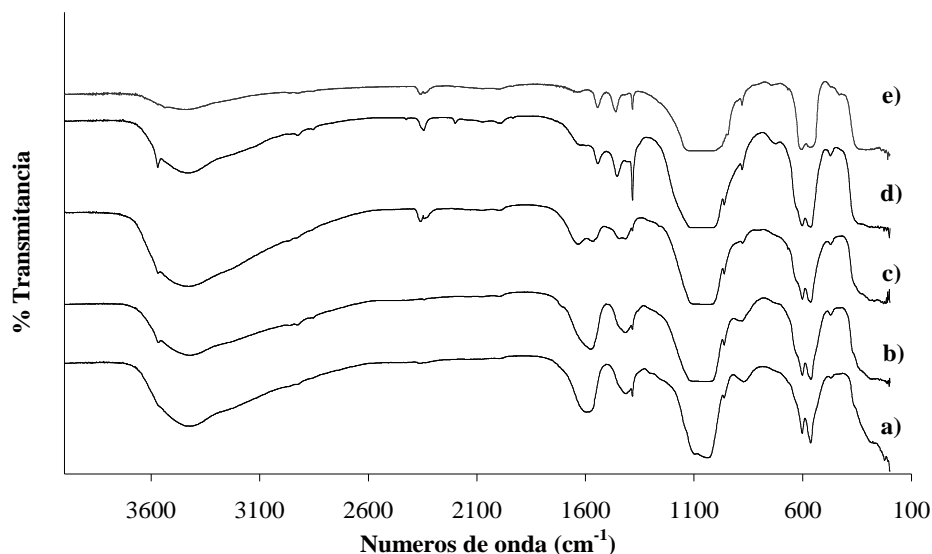


Figura 29- Espectro de FTIR dos grânulos $\text{Gra}_{5:1}$ (a); calcinados a 200°C (b); 400°C (c); 600°C (d) e 800°C (e)

A análise dos espectros de RX dos grânulos tratados termicamente às diferentes temperaturas revelou que, para os dois tipos de grânulos $\text{Gra}_{3:1}$ e $\text{Gra}_{5:1}$, só se observam alterações de cristalinidade após tratamento térmico a 800°C (Figura 30). Nesta situação observa-se um forte aumento da cristalinidade e o aparecimento de uma nova fase cristalina, o β -TCP. A pequena perda de massa observada na curva de ATG a cerca de 800°C pode ser associada à formação desta nova fase cristalina, atendendo a que a cristalização do β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) a partir de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é acompanhada pela perda de H_2O [144]. A formação de uma nova fase cristalina β -TCP é também suportada pelo espectro de FTIR dos grânulos tratados termicamente a 800°C . Neste espectro é possível constatar a presença de uma banda correspondente à ligação P-O da vibração do grupo HPO_4^{2-} a 948 cm^{-1} e uma outra banda a 970 cm^{-1} pertencente à ligação P-OH da vibração do grupo PO_4 da estrutura cristalina do β -TCP [19, 139]. Para além destas bandas existem outras correspondentes ao β -TCP. Porém, encontram-se

sobrepostas por outras mais intensas e por essa razão não aparecem definidas nos espectros de FTIR mas estão presentes a 1120, 1042, 604 e a 433 cm^{-1} [145].

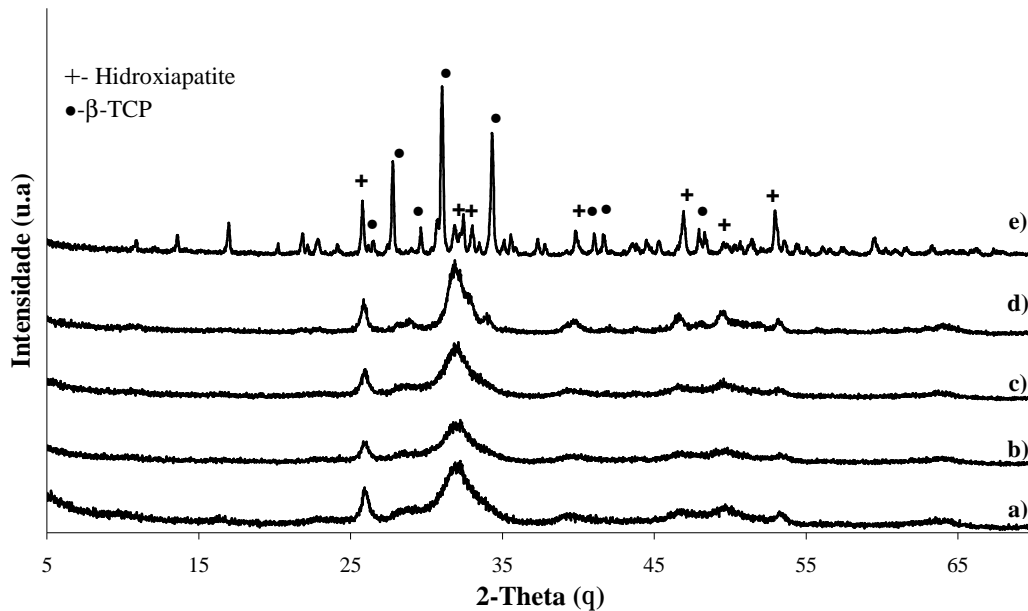


Figura 30-Difracção de RX dos grânulos Gra_{5:1} (a); calcinados a 200°C (b); a 400°C (c); a 600°C (d) e a 800°C (e).

A partir das análises de SEM dos grânulos Gra_{3:1} tratados termicamente a 800°C (Figura 26) não é possível precisar por observação, se as duas fases cristalinas (hidroxiapatite e β -TCP) estão presentes no mesmo ou em grânulos distintos. Por essa razão recorreu-se ao microscópio de transmissão de electrões (TEM) para averiguar se as duas fases cristalinas distintas coexistem ou não no mesmo grânulo.

Na Figura 31-a e b estão documentadas as características morfológicas dos grânulos Gra_{3:1} tratados termicamente a 800°C. Observa-se a existência de subunidades denominadas “cristalites” (assinaladas a azul na figura), com morfologia irregular e com um comprimento da ordem dos 20 nm e uma largura de cerca de 40 nm. Estes tamanhos da cristalite são da mesma ordem de grandeza das partículas originais precursoras Hap_{3:1}.

Da análise da Figura 31 observa-se também que os grânulos são instáveis à exposição ao feixe, ou seja, ocorrem modificações da morfologia das cristalites após alguns segundos de exposição ao feixe electrónico. As cristalites de forma alongada desaparecem dando origem a uma região amorfisada com uma forma difusa. Ocorrências de modificações morfológicas similares foram também reportadas para partículas de hidroxiapatite

preparadas por precipitação química em meios aquosos [28]. Estudos de TEM realizados por Nicolopoulos e seus colaboradores [144] com partículas de hidroxiapatite precipitadas verificaram que após a exposição ao feixe ocorriam uma transformação de fase: hidroxiapatite para α -TCP, uma fase cristalina de fosfato de cálcio de alta temperatura ($T \sim 1150^\circ\text{C}$) [146]. Segundo os autores este comportamento pode ser explicado pelas elevadas temperaturas induzidas localmente pela exposição ao feixe electrónico. Este argumento não permite no entanto explicar a amorfização de uma região cristalina da amostra que se observa no presente estudo.

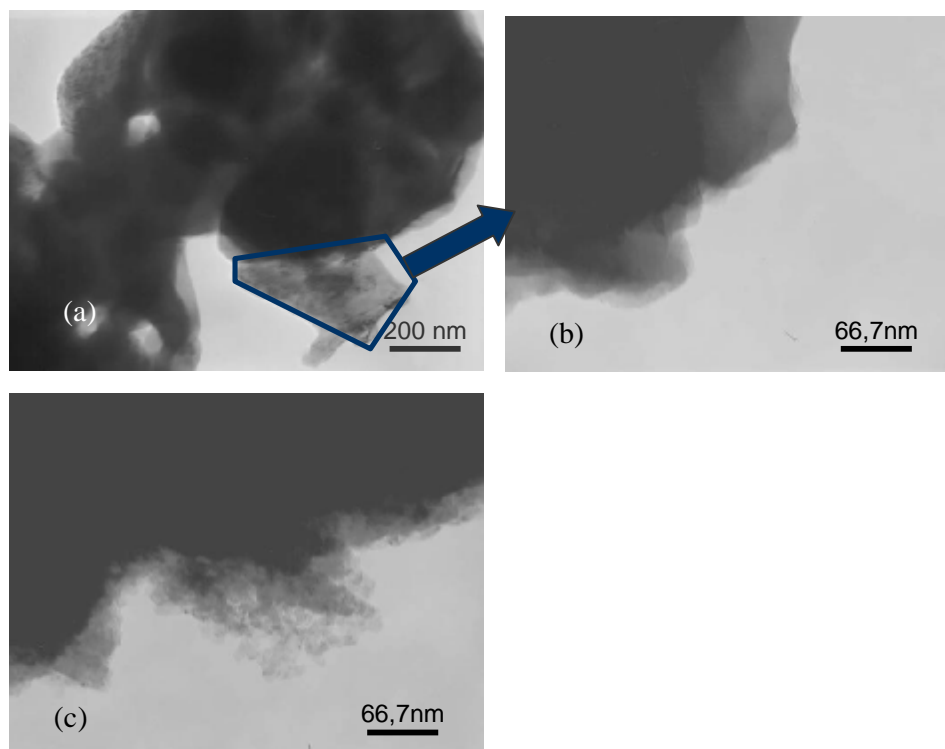


Figura 31- Micrografia de TEM das partículas Gra_{3:1} 800 com tempo de 0 segundos de exposição ao feixe (a, b) e tempo de exposição ao feixe de 15 segundos (c)

A difracção de electrões das duas estruturas cristalinas (hidroxiapatite e β -TCP) está documentada na Figura 32. A recolha das imagens de difracção de electrões só foi possível nas regiões mais periféricas dos grânulos devido à espessura do material ser menor nessas regiões. Para a identificação das duas estruturas cristalinas e a indexação dos índices de Miller dos “spots” de difracção recorreu-se ao programa de modelação Carine. Os dados necessários para a modelação das duas estruturas cristalinas foram retirados da literatura

[23]. Da comparação de distâncias entre os “spots” apresentados nos microdifractogramas de electrões e os obtidos na simulação do espaço recíproco das estruturas cristalinas usando o programa Carine, concluiu-se que a direcção de difracção $\langle 100 \rangle$ é a que retrata melhor a direcção de difracção das duas estruturas cristalinas, ou seja, da hidroxiapatite e do β -TCP.

Os microdifractogramas apresentados na Figura 32 foram obtidos em cristalites diferentes no mesmo grânulo. Estes resultados confirmam os resultados de difracção de RX e demonstram ainda a coexistência das duas fases cristalinas (Hap e β -TCP) no mesmo grânulo.

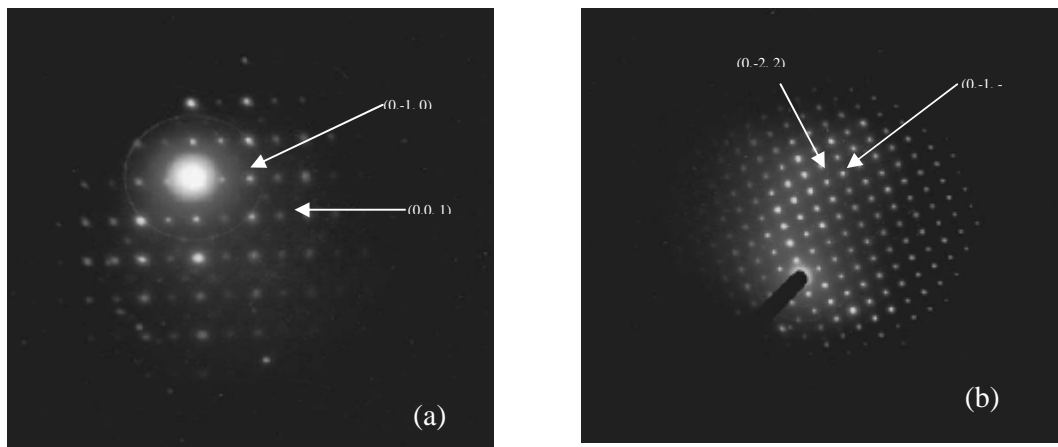


Figura 32- Difracção de electrões obtido por TEM para duas estruturas cristalográficas a) hidroxiapatite; b) β -TCP

Deste estudo pode concluir-se que as diferentes características morfológicas das partículas precipitadas de Hap foram determinantes para a microestrutura dos grânulos atomizados e para a sua evolução durante o tratamento térmico. Dispõe-se assim de materiais com diferentes áreas superficiais e com diferentes fases cristalinas, com potencialidades para serem estudados como suporte de um fármaco. Os materiais seleccionados para esse estudo foram os Gra_{3:1}, e os Gra_{3:1 800}, porque apresentam diferentes características morfológicas, diferentes áreas superficiais e diferentes fases estruturas cristalinas.

4. Adsorção de 5-Flourouracil por grânulos de Hap

4.1. Estudos de Equilíbrio

Efectuaram-se estudos de adsorção de 5-FU na superfície dos grânulos Gra_{3:1} preparados por atomização de suspensões de partículas previamente precipitadas em presença de citratos. Para diferentes concentrações iniciais de fármaco (0,25; 0,5; 1,5; 5 e 10g/L) avaliou-se, à temperatura ambiente, a variação da quantidade de 5-FU adsorvida. O valor do pH inicial das soluções variou entre 4.95 e 5.2 quando a concentração de 5-FU da solução variou entre 10g/L e 0,25g/L, respectivamente. Na Figura 33 representa-se graficamente a variação da quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa de grânulos Gra_{3:1} (Q_e , mmol/g) em função da concentração de equilíbrio do soluto na solução (C_e , mmol/L) em condições de equilíbrio. Observa-se que, na gama de baixos valores de C_e , pequenos incrementos em C_e originam elevados aumentos de Q_e o que indica existirem bastantes sítios acessíveis para a adsorção do 5-FU. Porém, à medida que C_e aumenta, a variações equivalentes de C_e correspondem aumentos sucessivamente menos significativos em Q_e , evoluindo-se assim para um patamar indicador da saturação da

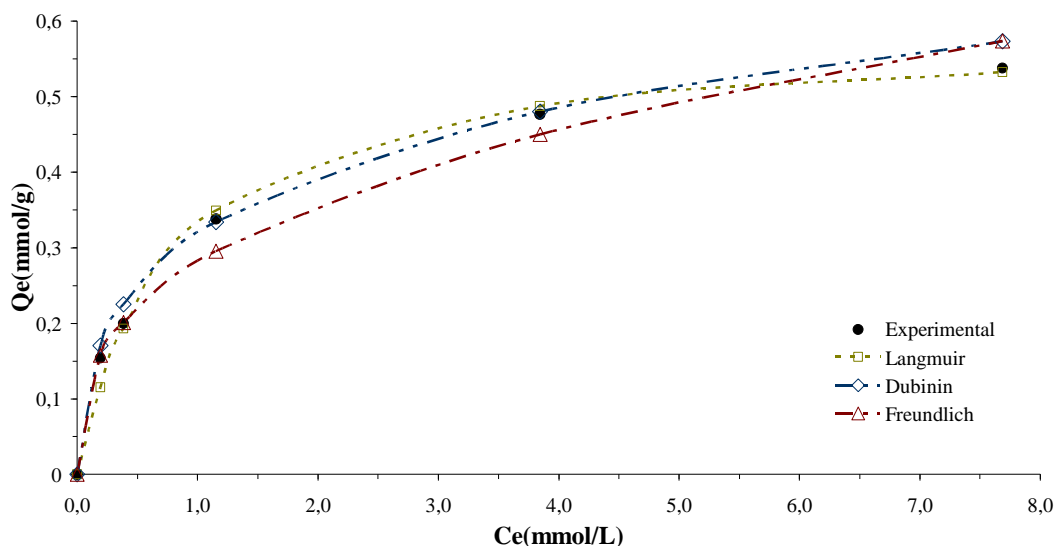


Figura 33— Isotérmicas de adsorção do 5-FU por grânulos Gra_{3:1} (●) resultados experimentais; (-□-) isotérmica de Langmuir; (-◇-) isotérmica de Dubinin-Radushkevich; (-△-) isotérmica de Freundlich.

capacidade adsorptiva dos grânulos. Este comportamento pode indicar a diminuição da quantidade de sítios activos disponíveis e/ou a dificuldade das moléculas de 5-FU adsorverem nos grânulos, pois as moléculas já adsorvidas envolvem parcialmente os locais activos disponíveis da superfície [54, 68].

São conhecidos vários modelos de equação, as chamadas isotérmicas de adsorção, para descrever a adsorção de solutos por sólidos. Entre os modelos mais utilizados e conhecidos podem citar-se a isotérmica de Langmuir, a de Freundlich e a de Dubinin-Radushkevich.

A primeira isotérmica, a de Langmuir, distingue-se por assumir que a variação de energia envolvida no processo adsorptivo é equivalente em todos os locais de adsorção. O modelo de Freundlich já introduz alterações neste conceito pois considera que a energia de adsorção varia consoante o sítio de adsorção. A última isotérmica referenciada, a de Dubinin-Radushkevich, evidencia-se por ser usada em adsorventes com porosidade.

As equações das três isotérmicas citadas são as seguintes:

Isotérmica de Langmuir:

$$C_e/q_e = (1/K_L) + (a_L/K_L) \cdot C_e \quad (\text{Eq.3})$$

Isotérmica de Freundlich:

$$\log q_e = \log K_F + (1/n) \log C_e \quad (\text{Eq.6})$$

Isotérmica de Dubinin-Radushkevich:

$$\ln q_e = \ln q_m - \beta \varepsilon^2 \quad (\text{Eq.7})$$

Sendo

$$\varepsilon = RT \ln(1 + (1/C_e)) \quad (\text{Eq. 8})$$

K_L corresponde à constante de afinidade de Langmuir e a razão K_L/a_L à capacidade de saturação da monocamada [54, 56, 77]. K_F é conhecida como a constante de Freundlich e reflecte a afinidade adsorptiva do material adsorvente [54, 77]. No que respeita a ε e β são constantes da equação isotérmica de Dubinin-Radushkevich; ε corresponde ao potencial de Polanyi que está relacionado com a concentração de equilíbrio e β correlaciona-se com a energia de adsorção [48, 56].

Na Figura 33 representou-se a evolução de Q_e prevista por cada uma das isotérmicas em análise. Observa-se que o modelo de adsorção de Langmuir é o que melhor se ajusta aos valores experimentais obtidos.

Na tabela 4 apresentam-se os coeficientes de correlação (r^2) que caracterizam o ajuste de cada uma das isotérmicas (Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich) aos valores experimentais de Q_e , os valores calculados das constantes de adsorção (K_L , K_F) correspondentes às isotérmicas de Langmuir e Freundlich, respectivamente, bem como da capacidade de adsorção (Q_0 , q_m) prevista pelo modelo de Langmuir e de Dubinin-Radushkevich, respectivamente.

Tabela 4- Constantes de Langmuir, Freundlich e Dubinin-Radushkevich

| Langmuir | | | | Freundlich | | | Dubinin-Radushkevich | | | |
|----------|---------|----------|--------|------------|------|--------|----------------------|--------------------------------------|---------------|--------|
| K_L | a_L | Q_0 | r^2 | K_F | n | r^2 | q_m | β | ε | r^2 |
| (L/g) | (L/mol) | (mmol/g) | | (L/g) | | | (mmol/g) | (mmol ² /J ²) | (KJ/mmol) | |
| 0,064 | 106 | 0,6 | 0,9982 | 0,032 | 2,86 | 0,9917 | 1,03 | 4×10^{-9} | 11,18 | 0,9974 |

O melhor coeficiente de correlação (0,9982) corresponde à isotérmica de Langmuir. De acordo com os pressupostos deste modelo de adsorção, poderá afirmar-se que o 5-FU tem tendência a formar uma monocamada na superfície das partículas, sendo a capacidade de saturação dessa monocamada expressa por Q_0 , ou seja, 0,6 mmol/g. Usando o programa de modelação molecular KnowItAll® Academic Edition [147] estimou-se o valor da área ocupada por uma molécula de 5-FU como sendo de 30 \AA^2 (os detalhes desse cálculo estão apresentados no anexo 1). Considerando que a fracção de área coberta é unitária, ou seja que a superfície do material está totalmente coberta com moléculas de 5-FU, é possível através da equação 5 avaliar a capacidade teórica da monocamada:

$$1/Q_0 = N_A \sigma^0 / A_{sp} \quad [60] \quad (\text{Eq.5})$$

Esse cálculo prevê uma capacidade de 0,83 mmol/g, valor esse que é significativamente superior ao valor estimado com base na isotérmica de Langmuir, (0,6 mmol/g), o que indica que a quantidade de moléculas de 5-FU adsorvidas na superfície dos grânulos é inferior à quantidade máxima prevista. Esta diferença pode ser devida à presença de grupos citratos na superfície dos grânulos de apatite, possivelmente como espécies adsorvidas que disputam uma parte dos locais disponíveis para a adsorção do 5-FU (Figura 34). Os espectros de FTIR (Figura 35) comprovam, efectivamente, a persistência de grupos citrato na superfície dos grânulos ao longo do processo de adsorção.

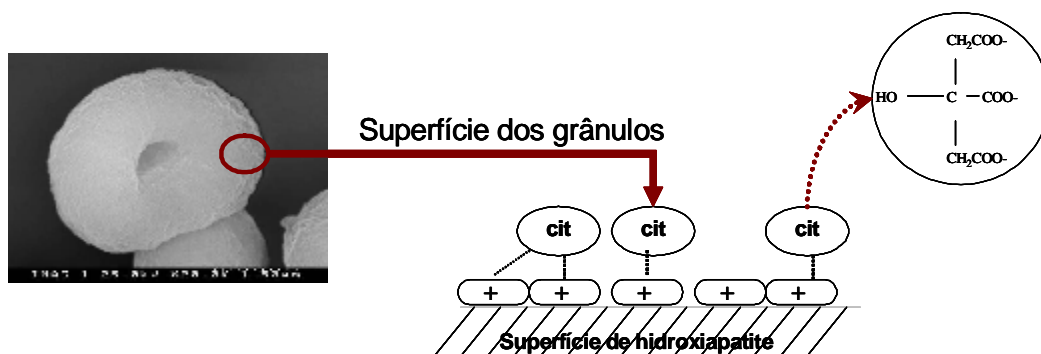


Figura 34- Esquema ilustrativo do estado de superfície dos grânulos antes do início do processo de adsorção do 5-FU.

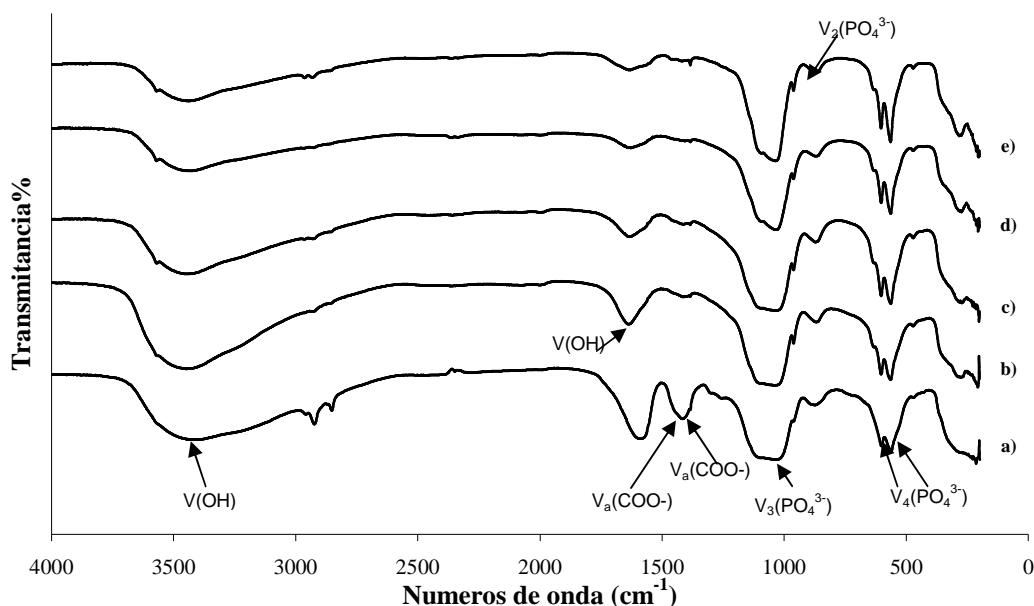


Figura 35- Espectros de FTIR dos grânulos Gra_{3:1} (a); e após 0,5 dias de adsorção (b); 1 dia de adsorção (c); 3 dias de adsorção (d) e 7 dias de adsorção de 5-FU (e);

Na tentativa de esclarecer o papel dos citratos no processo de adsorção do 5-FU na superfície dos grânulos Gra_{3:1}, realizaram-se alguns estudos comparativos do processo de adsorção de 5-FU em partículas comerciais de hidroxiapatite (Hap), com e sem citratos adsorvidos na sua superfície. Na secção 4.3. discutir-se-ão os resultados obtidos.

4.2. Estudos Cinéticos

Na Figura 36 apresenta-se a evolução da quantidade de 5-FU adsorvida com o tempo de imersão dos grânulos na solução de fármaco. Observa-se que a quantidade de 5-FU adsorvida aumenta rapidamente no período inicial, evoluindo depois para um valor constante. O tempo necessário para se atingir o patamar da quantidade de fármaco adsorvida, o tempo de equilíbrio, é variável com a concentração inicial de 5-FU na solução: genericamente tende a aumentar quando a concentração do fármaco aumenta.

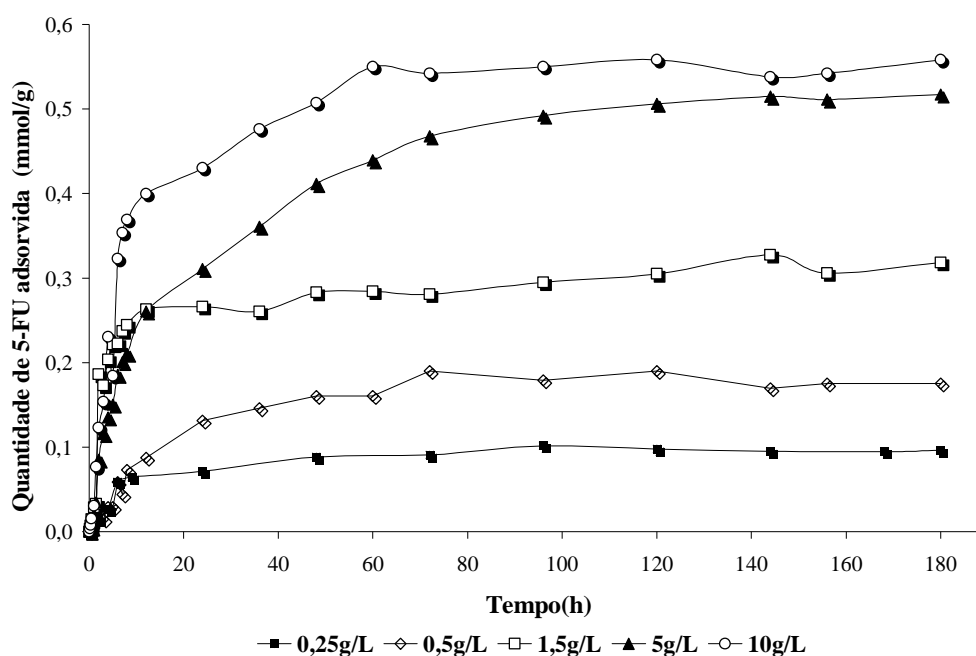


Figura 36-Adsorção de 5-FU por grânulos de HAP em soluções de 5-FU com concentrações de 0,25; 0,5; 1,5; 5 e 10 g/L

Na tentativa de entender os diferentes passos envolvidos no processo de adsorção tais como, transferência de massa e reacções químicas, recorre-se frequentemente à identificação de modelos cinéticos que descrevam adequadamente os dados experimentais. Muitos modelos tais como o modelo de difusão em superfície homogênea, o modelo de difusão em poro, o modelo de difusão heterogêneo (também conhecido como modelo de difusão e de poro) têm sido frequentemente utilizados para descrever o transporte dos adsorbatos para a superfície das partículas adsorventes [56, 77]. Existe também um vasto número de equações para descrever cinéticas de reacções [78]. No presente estudo

analisar-se-ão três conhecidos modelos frequentemente utilizados na descrição da cinética de adsorção de diversas substâncias pela hidroxiapatite [148, 149]: o modelo de pseudo primeira ordem, o de pseudo segunda ordem e o modelo de difusão intrapartícula, cujas equações se podem expressar da seguinte forma:

Pseudo primeira ordem:

$$\text{Log } (q_e - q_t) = \text{log } q_e - (k_1/2.303) \times t \quad (\text{Eq.14})$$

Pseudo Segunda ordem:

$$t/q_t = 1/(K_2 q_e^2) + (1/q_e) \times t \quad (\text{Eq.15})$$

Difusão intrapartícula:

$$q_t = k_p t^{1/2} \quad (\text{Eq.16})$$

sendo q_e e q_t a quantidade de 5-FU adsorvida ao fim do tempo equilíbrio e do tempo t , respectivamente. K_1 , K_2 e K_p são as constantes de equilíbrio para uma adsorção de primeira ordem, segunda ordem e difusão intrapartícula, respectivamente.

Na Figura 37 está graficamente documentada a aplicação do modelo cinético de pseudo primeira ordem para as concentrações em estudo. Observa-se claramente que a evolução de quantidade de fármaco adsorvida prevista pelo modelo (rectas da Figura 37) se afasta significativamente da registada experimentalmente (símbolos). Os valores de q_e previstos pelo modelo ($q_{e, \text{cal}}$) (Tabela 5), determinados a partir dos declives das rectas, apresentam

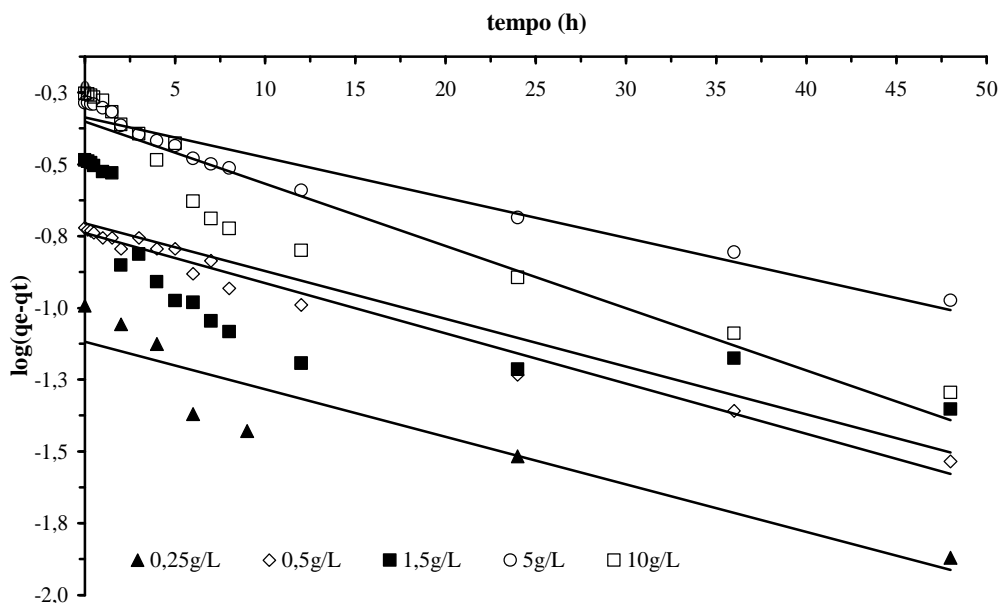


Figura 37- Comparação entre a evolução experimental da quantidade de fármaco adsorvida (\blacktriangle , \diamond , \blacksquare , \circ , \square) e a evolução prevista pela cinética de pseudo primeira ordem (—), para as diferentes concentrações de 5-FU na solução.

desvios apreciáveis dos experimentalmente observados. Para além disso verifica-se que o coeficiente de correlação (r^2) referente ao modelo cinético de pseudo primeira ordem (tabela 5) apresenta grande oscilação de valores para as diferentes concentrações estudadas. Este conjunto de observações sugere que o processo de adsorção do fármaco pelos grânulos não é adequadamente descrito por uma cinética de reacção de pseudo primeira ordem.

Tabela 5- Comparação de alguns parâmetros referentes aos modelos de pseudo primeira ordem, pseudo segunda ordem e difusão intrapartícula: coeficiente de correlação (r^2), constantes cinéticas (K_1 , K_2 e K_p) e quantidade de fármaco adsorvida ao fim do tempo de equilíbrio ($q_{e,cal}$).

| Concentração g/L | Pseudo Primeira Ordem | | | Pseudo Segunda ordem | | | Difusão intrapartícula | |
|------------------|--------------------------|----------------|-------|--------------------------|---------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| | $q_{e, cal}$ (mmol/g) | K_1 (l/h) | r^2 | $q_{e, cal}$ (mmol/g) | K_2 (g/mmol.h) | r^2 | K_p (mmol/g.h ^{1/2}) | r^2 |
| 0,25 | 0,076 | 0,038 | 0,861 | 0,101 | 1,303 | 0,997 | $1,96 \times 10^{-2}$ | 0,845 |
| 0,5 | 0,182 | 0,040 | 0,981 | 0,201 | 0,273 | 0,979 | $2,02 \times 10^{-2}$ | 0,812 |
| 1,5 | 0,197 | 0,038 | 0,587 | 0,319 | 0,803 | 0,997 | $8,91 \times 10^{-2}$ | 0,807 |
| 5 | 0,461 | 0,032 | 0,940 | 0,558 | 0,129 | 0,998 | $6,99 \times 10^{-2}$ | 0,865 |
| 10 | 0,444 | 0,050 | 0,877 | 0,574 | 0,283 | 0,999 | $11,45 \times 10^{-2}$ | 0,778 |

A representação gráfica de (t/q_t) em função do tempo de adsorção, indicada para a identificação um modelo cinético de pseudo segunda ordem, é apresentada na Figura 38.

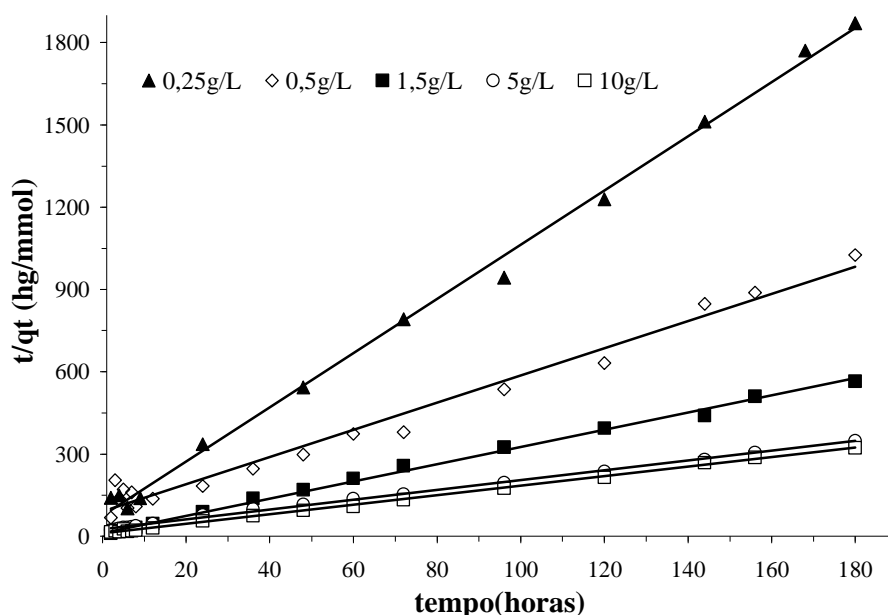


Figura 38- Comparação entre a evolução experimental da quantidade de fármaco adsorvida (▲, ◇, ■, ○, □) e a evolução prevista pela cinética de pseudo segunda ordem (—), para as diferentes concentrações de 5-FU na solução.

Dos declives e ordenadas das várias rectas que traduzem a evolução da quantidade de fármaco adsorvida descrita pelo modelo, para as diferentes concentrações de 5-FU, obtiveram-se os valores da constante K_2 e de $q_{e,cal}$ que se apresentam na Tabela 5, conjuntamente com o coeficiente de correlação (r^2). Observa-se que o coeficiente de correlação referente à cinética de reacção de pseudo segunda ordem é, para todas as concentrações de fármaco, superior a 0,979. Os valores calculados de q_e estão também concordantes com os valores experimentais obtidos como se pode constatar na Figura 36. Estes resultados parecem pois indicar que a adsorção do 5-FU pelos grânulos é satisfatoriamente descrita por um modelo cinético de pseudo segunda ordem.

Na Figura 39 apresenta-se a tentativa de ajuste do modelo de difusão intrapartícula aos valores experimentais da quantidade de fármaco adsorvido. Segundo este modelo, a difusão intrapartícula, quando aplicável, manifesta-se após um período inicial durante o qual ocorre a difusão do fármaco do seio da solução para a superfície dos grânulos, período este muitas vezes designado por estágio de adsorção instantâneo [56, 79]. As rectas apresentadas na figura traduzem assim a evolução da quantidade de fármaco adsorvida prevista pelo modelo de difusão intrapartícula, após um curto período inicial, referente ao

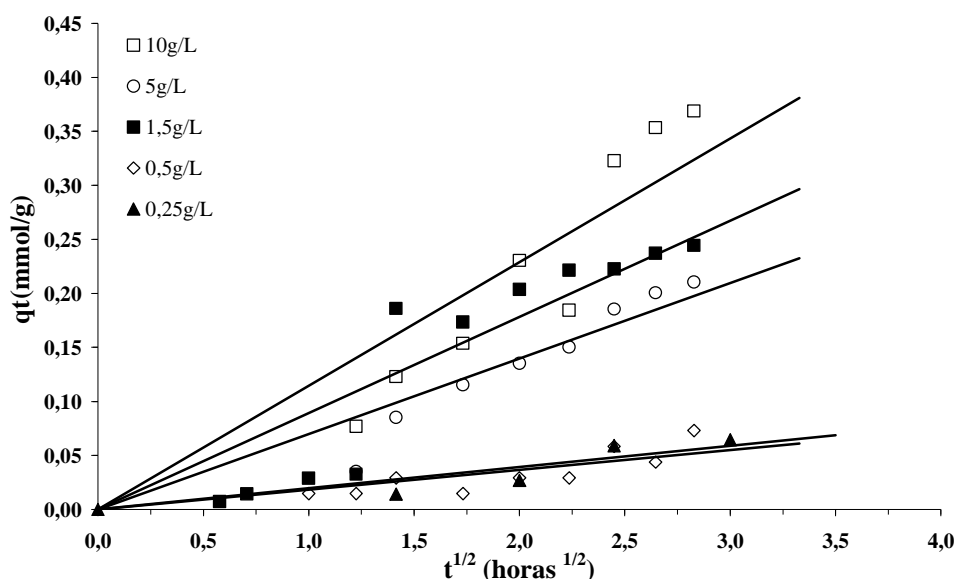


Figura 39- Modelação de adsorção do 5-FU pelos grânulos, usando a cinética de difusão intrapartícula, para diferentes concentrações do fármaco em solução. Cinética de reacção de adsorção de difusão intrapartícula do 5-FU em grânulos a diferentes concentrações iniciais (▲) 0,25g/L; (◇) 0,5g/L; (■) 1,5g/L; (○) 5g/L; (□) 10g/L

transporte do fármaco para a superfície dos grânulos. Como se pode observar o ajuste dos pontos experimentais aos modelos afigura-se discutível, nomeadamente para a concentração mais elevada de fármaco, sendo aceitável para as mais baixas concentrações de fármaco. É possível que outros mecanismos que não a difusão intrapartícula operem também neste caso, embora os valores dos coeficientes de difusão intrapartícula apresentem ordem de grandeza semelhante à dos valores reportados para outros sistemas [56].

As conclusões a registar da discussão dos três modelos estão enquadradas pela Figura 40 onde se podem globalmente comparar as evoluções dos valores experimentais e as tendências de evolução previstas pelos três modelos, para uma das concentrações de fármaco, 5g/L. Observa-se que o modelo de pseudo segunda ordem é o que melhor se adapta aos resultados experimentais ao longo de todo o tempo de adsorção. Observa-se também que o modelo de pseudo primeira ordem não se adequa aos presentes resultados e que o modelo de difusão intrapartícula, num determinado período de tempo se ajusta aceitavelmente aos valores obtidos experimentalmente. Estas conclusões permitem constatar que não existe um modelo cinético único que descreva a adsorção do 5-FU pelos grânulos, embora o modelo de pseudo segunda ordem seja aquele que melhor descreve a

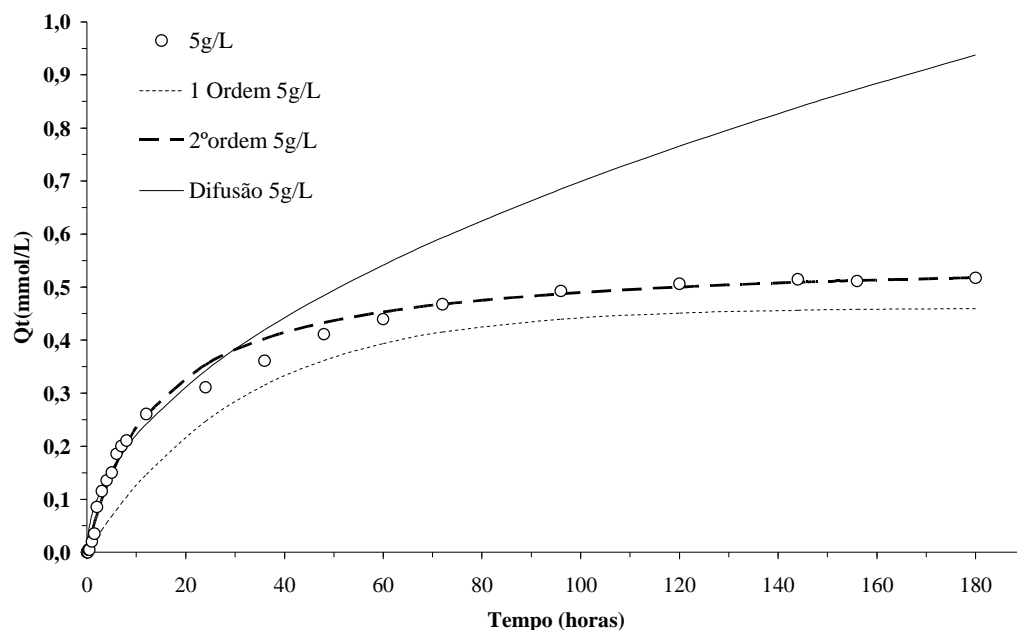


Figura 40- Comparação entre os valores experimentais e os modelos cinéticos em função do tempo para a concentração de 5-FU de 5g/L (○);

cinética de adsorção durante todo o período de tempo. Conclusões semelhantes, em sistemas diferentes têm sido também referidas por outros autores [56].

4.3. Influência dos grupos citratos na adsorção de 5-FU

Com o objectivo de elucidar o papel dos citratos no processo de adsorção do fármaco analisar-se-ão na presente secção os resultados obtidos em ensaios de adsorção de 5-FU em partículas de Hap comerciais, originais ou previamente tratadas com citratos. Tal como já anteriormente referidas as partículas comerciais e os grânulos são ambos constituídos por uma única fase cristalina, a hidroxiapatite, verificando-se no entanto que a cristalinidade das partículas comerciais é superior à dos grânulos (Figura 41), facto este documentado pela melhor definição dos picos de difracção de RX no primeiro caso.

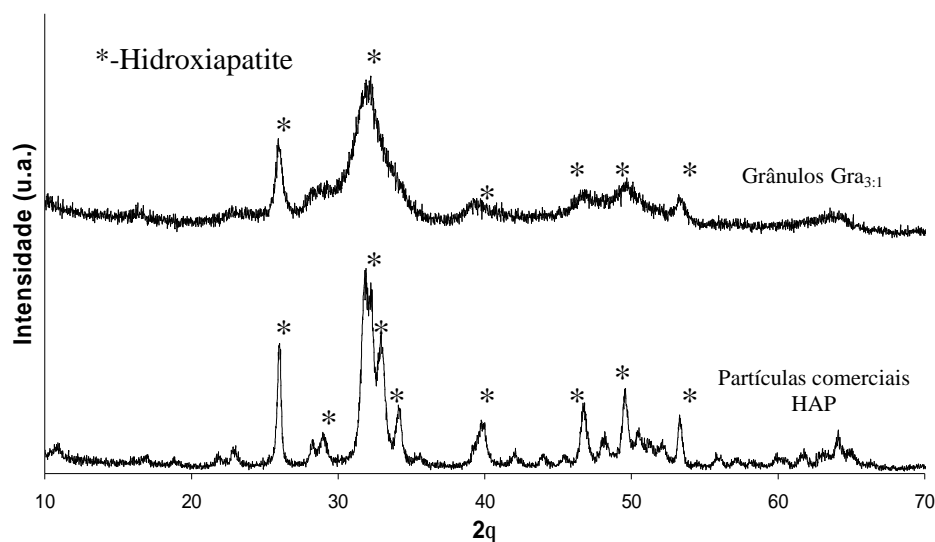


Figura 41-Comparação dos difractogramas (DRX) correspondentes às partículas comerciais (tal recebidas) e aos grânulos Gra_{3:1}.

As diferentes características morfológicas destes dois tipos de partículas (Figura 42), já anteriormente analisadas, e as suas distintas áreas superficiais (30m²/g no caso das partículas comerciais e 150m²/g no caso dos grânulos) reflectem, naturalmente, os diferentes processos usados na produção dessas partículas.

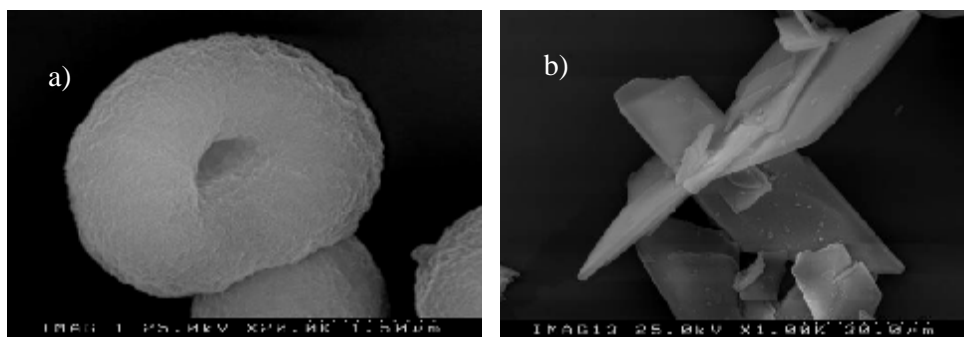


Figura 42-Imagem de SEM das partículas de HAP: (a) grânulos porosos e (b) partículas comerciais (tal qual recebidas)

Quando as partículas comerciais de Hap são imersas numa solução de citratos nas condições experimentais referidas em 2.1.1 (solução de citratos com pH=8,12, T=37°C e durante 24 horas), por forma a propiciar a adsorção dos grupos citratos na superfície dessas partículas, o seu estado de superfície altera-se efectivamente. A Figura 43 compara os espectros de FTIR das partículas comerciais Hap, antes e após adsorção de citratos, e o dos grânulos Gra_{3:1}. Para além das bandas características dos grupos fosfatos (PO_4^{3-}) presentes em todos os espectros [139], observa-se que, à semelhança do que ocorre nos espectros dos grânulos Gra_{3:1}, duas bandas a 1421 e 1620 cm^{-1} correspondentes á vibração dos grupos carboxílicos (COO^-) são claramente visíveis nos espectros das partículas comerciais

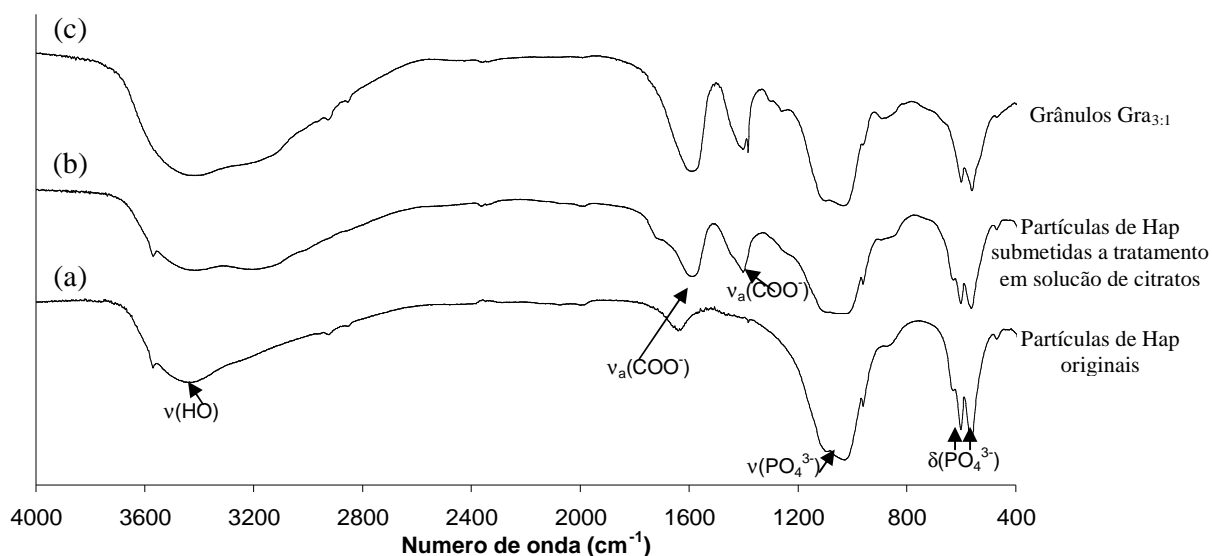


Figura 43-Espectros de FTIR de partículas de hidroxiapatite: (a) partículas comerciais originais, (b) partículas comerciais submetidas a tratamento com solução de citratos e (c) grânulos Gra_{3:1} de Hap.

submetidas a tratamento em solução de citratos, indicando pois a presença de grupos citrato adsorvidos na superfície destas partículas.

Segundo López-Macipe e seus colaboradores [58], diferentes espécies iônicas podem existir numa solução de citrato, dependendo do valor do pH da solução [58]. Em soluções de pH=8, 98% dos iões apresentam-se sob a forma de Cit^{3-} ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$) e ~2% como HCit^{2-} ($\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$). A espécie Cit^{3-} adsorve na superfície da hidroxiapatite assumindo uma configuração bidentada (dois grupos COO^- ligam-se a dois iões Ca^{2+} diferentes) ao passo que a adsorção do ião

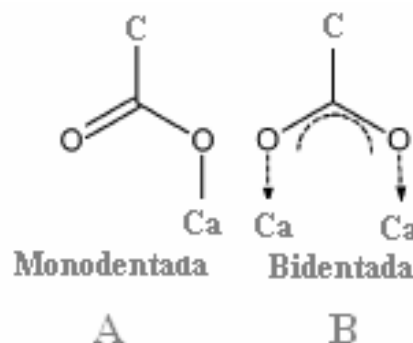


Figura 44- Esquema representativo das configurações monodentada (A) e bidentada (B) do ião citrato adsorvido, adaptado da ref. [58].

HCit^{2-} envolve a ligação de um grupo COO^- a um Ca^{2+} numa configuração monodentada [58, 150]. Dados as condições usadas durante o processo de adsorção é pois provável que, no presente caso, a maioria dos grupos citratos adsorvidos apresente uma configuração bidentada (Figura 44).

A Figura 45 ilustra a dependência dos potenciais zeta relativamente ao pH, para as diferentes partículas em análise: as comerciais originais, as comerciais depois de imersas

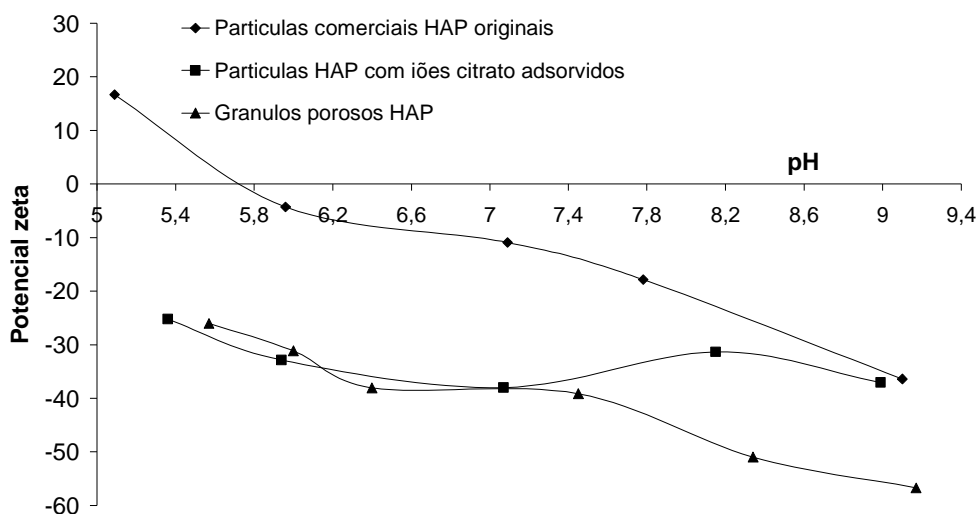


Figura 45-Dependência do potencial zeta relativamente ao pH para as diferentes partículas de Hap: (-◇-) partículas comerciais Hap originais, (-■-) partículas comerciais com iões citrato adsorvidos e (-▲-) grânulos Gra_{3:1}

numa solução de citratos e os grânulos Gra_{3:1}. Observa-se que as partículas comerciais não tratadas exibem uma carga superficial claramente superior á exibida pelos grânulos. No entanto a adsorção de grupos citratos na superfície das partículas comerciais modifica a sua carga superficial que se torna mais negativa. Observa-se também que na gama de valores de pH entre 5.4 e 7 as partículas comerciais de hidroxiapatite com citratos adsorvidos e os grânulos de Hap apresentam valores de potencial zeta muito próximos, o que sugere que estes dois tipos de partículas apresentam cargas superficiais comparáveis.

A adsorção do fármaco na superfície das diferentes partículas em análise está caracterizada na Figura 46 que apresenta a variação da quantidade adsorvida de 5-FU por unidade de área superficial de partícula ($\mu\text{moles}/\text{m}^2$) com o tempo de imersão das partículas na solução de fármaco (250 mg/L). Observa-se que a quantidade de 5-FU adsorvida por unidade de área é superior quando as partículas não têm citratos adsorvidos (partículas Hap originais). Este resultado indica pois que a presença de citrato na superfície das partículas inibe a adsorção do fármaco.

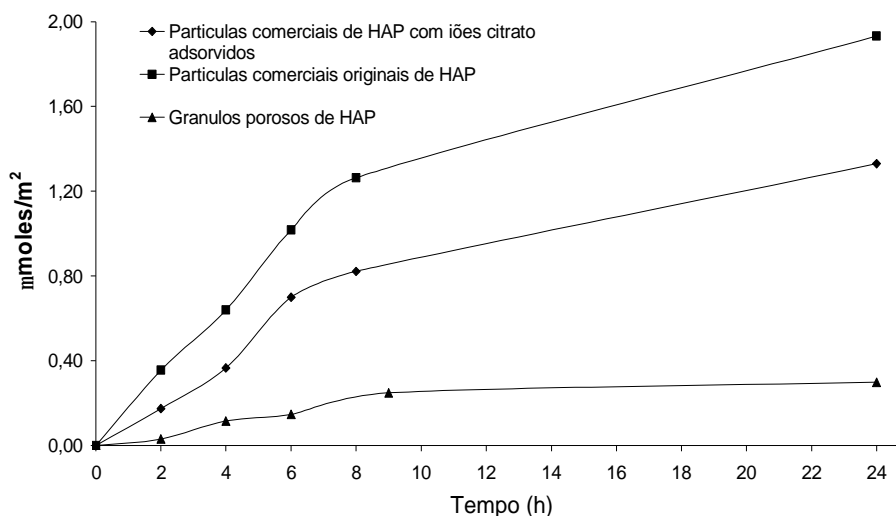


Figura 46-Variação da quantidade adsorvida de 5-FU com o tempo de carregamento para (-▲-) grânulos Hap, (-◇-) partículas comerciais com iões citratos pré-adsorvidos e (-■-) partículas comerciais originais

Na molécula de 5-FU (Figura 47) dois dos átomos de hidrogénio estão ligados a dois átomos de nitrogénio e um outro a um átomo de carbono do anel de pirimidina. Este composto é considerado um ácido fraco devido ao facto de ter dois átomos de hidrogénio ligados ao nitrogénio que são facilmente ionizados [91]. Tal como já foi referido a adsorção do fármaco foi conduzida numa solução a pH=5.2. Nessas condições de pH

espera-se que a molécula de 5-FU esteja, na sua maior parte, não dissociada, dado que, a $\text{pH}=7.4$, apenas 20% das moléculas de 5-FU estão desprotonadas [91]. A adsorção do fármaco na superfície das partículas comerciais de hidroxiapatite que, a $\text{pH}=5.2$ (Figura 45), apresenta carga positiva, deve envolver ligações com átomos da molécula do fármaco que possuam electrões não compartilhados, disponíveis, ou seja átomos de O, N, ou F. Este raciocínio pode também explicar a menor reactividade adsorviva das superfícies com carga mais negativa,

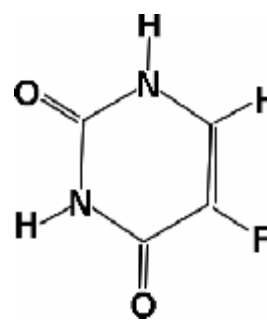


Figura 47- Estrutura molecular do 5-FU

nomeadamente os grânulos porosos e as partículas comerciais com citratos pré-adsorvidos (Figura 46). No entanto o comportamento adsorvivo destes dois tipos de partículas a $\text{pH}=5.2$ (Figura 46) mostra também que os grânulos porosos e as partículas com grupos citratos pré-adsorvidos, apesar de possuírem carga superficial semelhante a $\text{pH}=5.2$ (Figura 45), adsorvem quantidades diferentes de 5-FU. Consequentemente conclui-se que além da carga superficial das partículas, outros factores deverão ser tomados em consideração para descrever detalhadamente os mecanismos de adsorção do fármaco. Por exemplo, a força de ligação dos grupos citratos à superfície de cada um dos dois tipos de partículas, os grânulos $\text{Gra}_{3:1}$ e as comerciais tratadas com citratos, deverá ser presumivelmente diferente, atendendo às condições que regeram os processos de adsorção dos citratos em cada caso. Tal como já referido, os grânulos $\text{Gra}_{3:1}$ foram preparados com nanopartículas precipitadas a partir de soluções em que o cálcio existia complexo por citratos [138]. Neste caso os iões citrato estão fortemente ligados à superfície das partículas [138]. Comparativamente, as forças de ligação dos iões citrato à superfície das partículas comerciais serão menos intensas pelo que, neste caso, os iões citrato adsorvidos serão mais vulneráveis a processos de troca iónica com iões existentes na solução adjacente incluindo moléculas de 5-FU. A possibilidade da dessorção dos citratos, em maior extensão, durante o carregamento é pois uma hipótese que pode explicar a maior quantidade de 5-FU adsorvida pelas partículas comerciais previamente tratadas com citratos.

4.4. Mecanismos da adsorção do 5-FU nos grânulos

Na Figura 48 apresenta-se a evolução do pH da solução de fármaco com o tempo de adsorção de 5-FU pelos grânulos Gra_{3:1}. Observa-se que a curva de pH apresenta duas regiões distintas: uma região inicial correspondente às primeiras 24 horas em que o pH da solução apresenta oscilações significativas seguida de uma segunda região, mais extensa, em que se observa uma descida lenta e continua do pH até ao valor final de 5.8. A ampliação da região inicial da curva de pH (primeiras 24 horas, Figura 48) permite evidenciar que o pH da solução apresenta um aumento inicial repentino (de 5.2 até 6.03) que ocorre logo após a adição das partículas á solução. Atendendo a que os grânulos têm na sua superfície grupos citrato adsorvidos, a desorção de algumas dessas espécies negativas e a sua combinação com H⁺ da solução ácida envolvente poderá explicar o

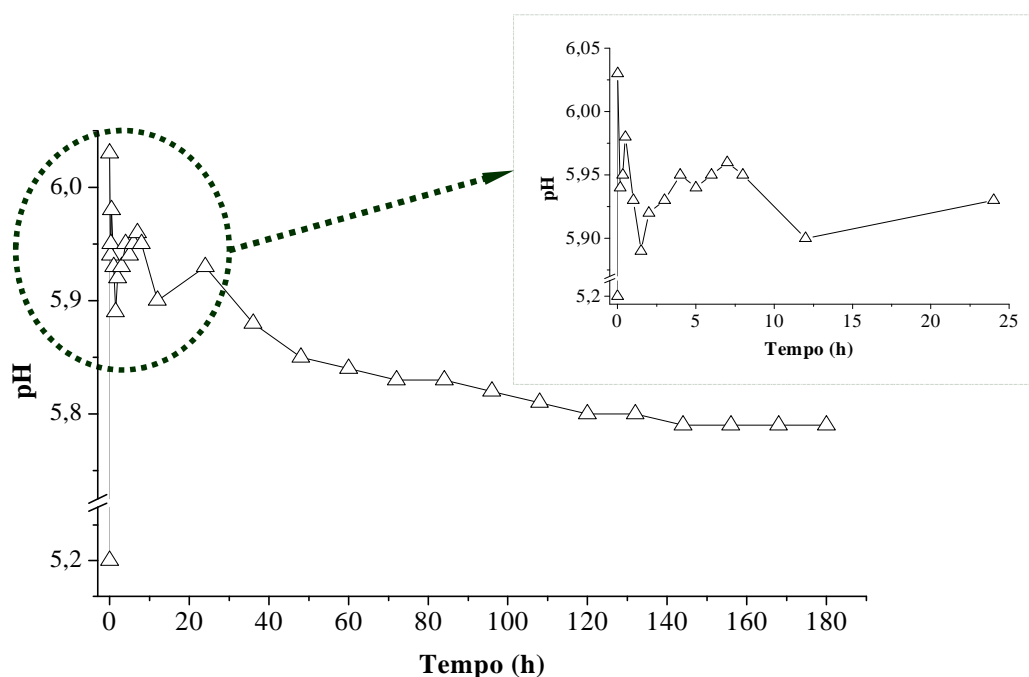
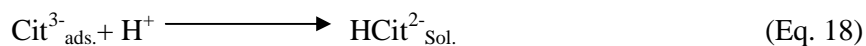


Figura 48- Variação do valor de pH com o tempo de adsorção de 5-FU pelos grânulos Gra_{3:1}

observado aumento de pH [58, 151]. Segundo o reportado na literatura a 25°C e a pH 5.6 a espécie de ião citrato mais abundante em solução é HCit²⁻ ao passo que a pH >8.0 predomina a espécie Cit³⁻ [58]. As nanopartículas Hap_{3:1} constituintes dos grânulos Gra_{3:1} foram preparadas em solução de citratos a pH=8.12. Por este facto pensa-se que a espécie

de citrato adsorvida é maioritariamente cit^{3-} , possivelmente numa configuração bidentada. A desorção da espécie cit^{3-} adsorvida poderá ser traduzida pela equação:



O andamento geral da curva de pH indica-nos que os fenómenos destabilizadores do pH da solução ocorrem fundamentalmente no primeiro dia de adsorção.

Por outro lado, à medida que decorre a adsorção do fármaco na superfície dos grânulos, as características de carga superficial destas partículas vão-se modificando. A Figura 49 documenta este facto: o potencial zeta dos grânulos diminui à medida que ocorre a

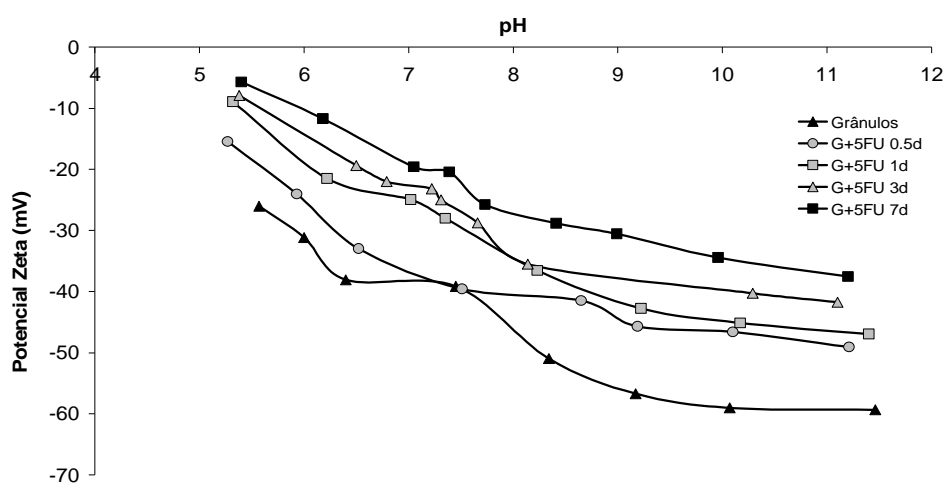


Figura 49- Medidas de mobilidade electroforética para a adsorção de 5-FU (5g/L) por grânulos Gra_{3:1}

adsorção do fármaco, o que indica que a superfície das partículas se vai tornando menos negativa à medida que o processo de adsorção tem lugar. Para além disso, as curvas de mobilidade electroforética mostram também que as alterações de carga superficial, na gama de valores de $\text{pH} < 6$, são mais significativas durante o 1º dia. Conciliando essa evidência com o facto de, tal como suportado pelos espectros de FTIR dos grânulos registados ao fim de diferentes tempos de adsorção de 5-FU (Figura 35), a quantidade de citratos adsorvidos diminuir com o tempo de imersão, mas mais significativamente ao longo do primeiro dia de adsorção, sugere-se o seguinte mecanismo: durante o primeiro dia de imersão dos grânulos na solução de fármaco, a adsorção de 5-FU na superfície das partículas ocorre em paralelo com a desorção de alguns grupos citratos o que globalmente contribui para o aumento da carga superficial das partículas que se torna menos negativa. Assim, as flutuações de pH observadas (Figura 48) durante o primeiro dia de adsorção

reflectem a dinâmica dos processos de desorção dos citratos e de adsorção de moléculas de 5-FU pelos grânulos.

Na Figura 50 apresenta-se uma ilustração esquemática deste mecanismo de adsorção do fármaco 5-FU pelos grânulos Gra_{3:1}.

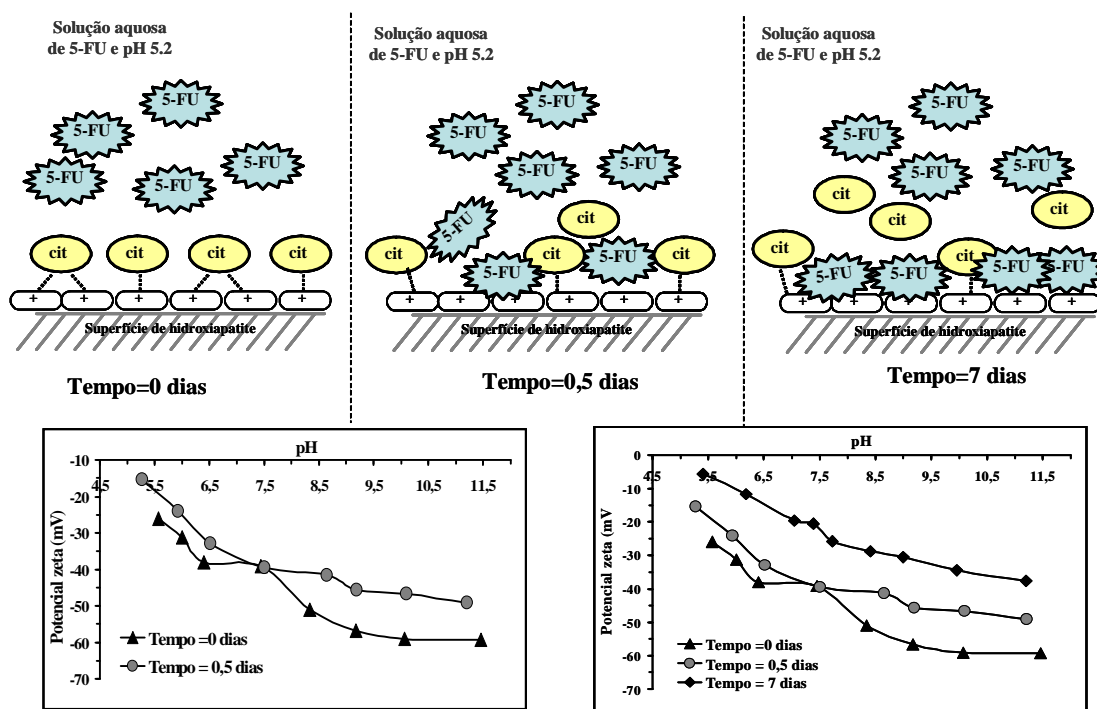


Figura 50- Esquema representativo do processo de adsorção do 5-FU por grânulos porosos de hidroxiapatite

Para melhor compreender o processo adsorptivo do 5-FU na superfície dos grânulos Gra_{3:1}, estudou-se a adsorção em duas soluções de fármaco (250mg/L) com pH estabilizado em valores diferentes. Para tal tamponizou-se a solução de fármaco com fosfato a pH=5.6 (valor médio de gama de variação do pH da Figura 48) e a pH=7.4. Os resultados obtidos podem ser analisados na Figura 51: observa-se que ao pH mais elevado (7.4) a quantidade de 5-FU adsorvida é praticamente o dobro da correspondente ao pH 5.6. Esperar-se-ia que, a pH 7.4, a quantidade de fármaco adsorvida fosse inferior à observada a pH 5.6 pois a pH 7.4 cerca de 20% das moléculas de 5-FU estão dissociadas, (pH 5.6 a dissociação é praticamente inexistente [91]) e a esse pH a superfície das partículas apresenta-se negativa, (como indicado no gráfico do potencial zeta (Figura 45)), pelo que, a pH 7.4, uma certa

quantidade de fármaco se encontra em condições desfavoráveis de adsorção por possuir carga eléctrica semelhante à da superfície dos grânulos.

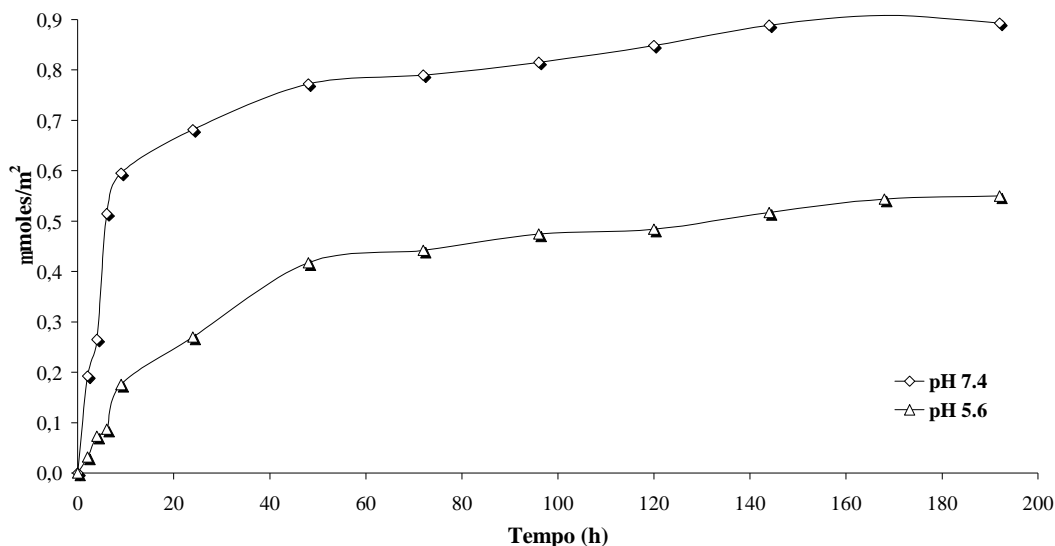
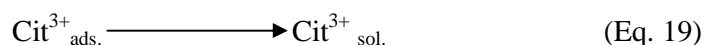
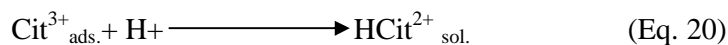


Figura 51- Variação da quantidade de 5-FU adsorvido por grânulos Gra_{3:1} em função do tempo de imersão á temperatura de 25°C para a concentração de 5-FU de 250mg/L (-Δ-) solução tampão de fosfatos pH 5.6 e (-◇-) solução de fosfatos a pH 7.4.

Atendendo, no entanto, a que os processos de equilíbrio em solução das diversas espécies de citratos são fortemente condicionadas pelo pH do meio, como já anteriormente referido, è possível que, a pH 7.4 a reacção



Seja dominante face à reacção



que se sugeriu a pH 5.6 [58].

No seguimento destas ideias, se a extensão da reacção (equação 19) for significativamente diferente da da reacção (equação 20), a quantidade de locais activos Ca^{2+} libertada pela reacção (equação 19), propiciando assim condições acrescidas para a adsorção do fármaco. Esta tentativa de interpretação carece no entanto de estudos mais aprofundados sobre os processos de adsorção dos citratos e seus equilíbrios em solução.

4.4.1. Adsorção em grânulos tratados a 800°C

A Figura 52 compara os resultados experimentais obtidos nos ensaios de adsorção de 5-FU nos grânulos Gra_{3:1} e nos mesmos grânulos Gra_{3:1}, após tratamento térmico a 800°C (Gra_{3:1 800}), usando uma concentração de fármaco de 250 mg/L. Observa-se que a quantidade de 5-FU adsorvida por unidade de área é superior no caso dos grânulos tratados termicamente a 800°C.

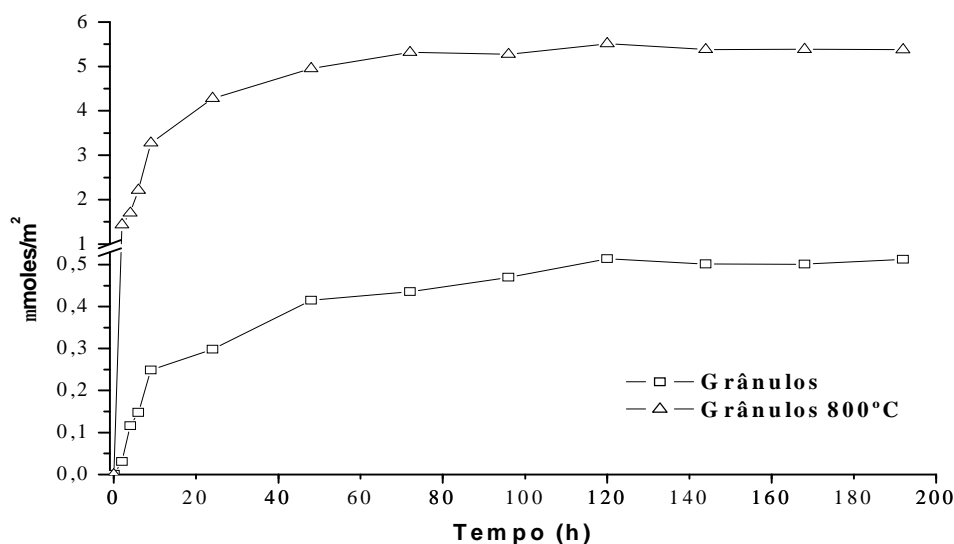


Figura 52- Variação da quantidade de 5-FU adsorvida com o tempo de imersão para (-□-) grânulos Gra_{3:1} e (-△-) para grânulos Gra_{3:1 800} tratados termicamente a 800°C

Como já referido na secção 3.4 os grânulos Gra_{3:1} e os grânulos Gra_{3:1 800} tratados termicamente distinguem-se do ponto de vista morfológico (ver Figura 26a e Figura 26e), apresentam área superficial distinta (150 m²/g para os grânulos Gra_{3:1} e 6,15 m²/g para os grânulos Gra_{3:1 800}) e possuem fases cristalinas diferentes: hidroxiapatite (pouco cristalina) no caso de Gra_{3:1} e uma mistura de hidroxiapatite e β-TCP (ambas com elevada cristalinidade) no caso dos grânulos tratados a 800°C. Acresce ainda que, de acordo com a caracterização FTIR de ambos os grânulos (Figura 29a e Figura 29e), os grânulos tratados a 800°C não evidenciam a presença de citratos.

Complementarmente pode referir-se ainda que as micrografias de SEM dos dois tipos de grânulos em análise, obtidas após o processo de adsorção (Figura 53 e Figura 54), quando comparadas com as referentes aos grânulos originais (Figura 26a e Figura 26e) revelam

que o processo de adsorção não induz alterações de morfologia destes grânulos. Tendo em consideração esta informação e atendendo ao facto de não ter sido detectado qualquer aumento do teor de cálcio nas soluções de adsorção usadas com os dois tipos de grânulos que pudesse indicar fenómenos de dissolução, sugere-se que o facto determinante da diferente capacidade adsortiva dos dois tipos de grânulos seja a ausência/presença de citratos: a decomposição dos citratos durante o tratamento térmico a 800°C liberta sítios activos para adsorção de 5-FU, justificando assim a maior capacidade adsortiva por unidade de área dos grânulos tratados termicamente.

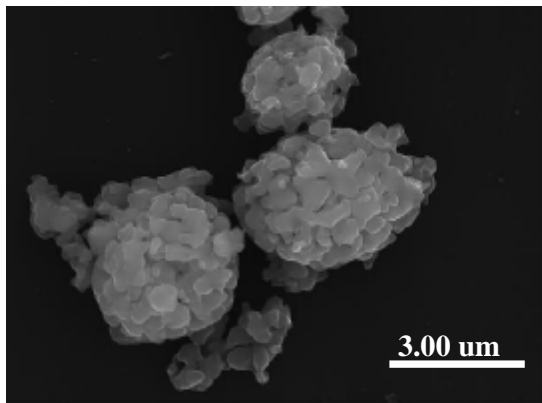


Figura 54- Micrografias de SEM dos grânulos ($\text{Gra}_{3:1}$) tratados termicamente a 800°C após a adsorção de 5-FU

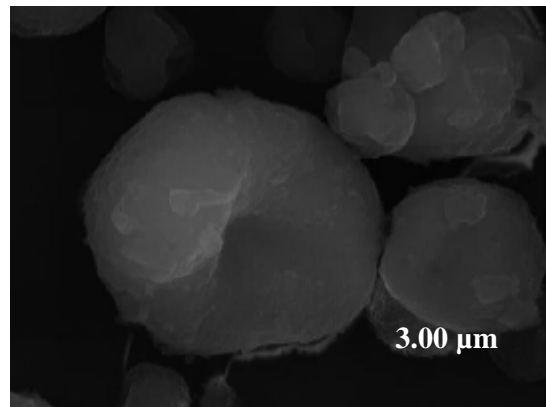


Figura 53- Micrografias de SEM dos grânulos $\text{Gra}_{3:1}$ após adsorção

Em paralelo com este factor poderão naturalmente considerar-se outras causas possíveis. Por exemplo o facto dos $\text{Gra}_{3:1\ 800}$ apresentarem uma nova fase cristalina, o β -TCP, como documentado no difractograma de RX apresentado no capítulo anterior, pode apontar no sentido de esta ser uma fase cristalina mais favorável á adsorção do 5-FU. Segundo os resultados reportados na literatura a hidroxiapatite e o β -TCP apresentam estruturas cristalográficas diferentes, sendo uma hexagonal e a outra romboédrica, respectivamente, e sendo diferentes os planos de maior densidade de iões cálcio e de iões fósforo nas duas estruturas [27]. É pois expectável que a aptidão adsortiva destas duas fases relativamente ao fármaco seja diferente. Os resultados de adsorção de 5-FU obtidos no presente estudo para os dois tipos de grânulos podem também reflectir estas diferenças.

Adicionalmente, pode ainda referir-se que a grande actividade das amostras muito cristalinas ($\text{Gra}_{3:1\ 800}$ tratadas termicamente) na adsorção do 5-FU, comparadas com os dos

grânulos pouco cristalinos ($\text{Gra}_{3:1}$), pode também ser atribuída à presença de maior concentração de defeitos na superfície que proporcionem lugares activos adicionais para a adsorção, defeitos esses provocados pelo tratamento térmico [68].

4.5. Atomização de suspensões de nanopartículas de Hap em 5-Flourouracil

Não têm sido reportados, na literatura estudos sobre suportes inorgânicos do fármaco 5-Flourouracil. Normalmente o composto anticancerígeno (5-FU) é incorporado num suporte polimérico por processos de atomização ou emulsão, ou ainda misturado e prensado obtendo-se tabletes de polímero e fármaco. Os suportes poliméricos utilizados com maior frequência são nomeadamente o PLGA, um protótipo poli(orto Ester) preparado com ácido láctico, o PEG e o EudragitP-4135F [43, 91, 94, 101, 102, 152, 153]. No presente trabalho tentou-se preparar, num passo único, um suporte do fármaco 5-FU para posterior utilização em estudos de libertação do fármaco, recorrendo-se para tal à atomização de uma suspensão de $\text{Hap}_{3:1}$ numa solução do fármaco 5-FU.

Como se descreveu no procedimento experimental, a uma solução de 5-FU (250mg/L) foram adicionadas partículas de hidroxiapatite (~1% peso) de dimensões nanométricas ($\text{Hap}_{3:1}$). A suspensão obtida foi atomizada e a análise do difractograma de raios-X das partículas atomizadas (Figura 55) revela que durante o processo de atomização se formam diferentes fases cristalinas: a bifosfamite ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), o nitrato de amónio ($\text{NH}_4(\text{NO}_3)$), o óxido de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{O}$), o ácido naftoico ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_2$), e a fluoroapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$). Esta diversidade de compostos de amónio indica que os iões amónio presentes nas partículas $\text{Hap}_{3:1}$, em consequência do método utilizado na sua preparação (precipitação em solução aquosa contendo iões amónio), precipitam durante a atomização.

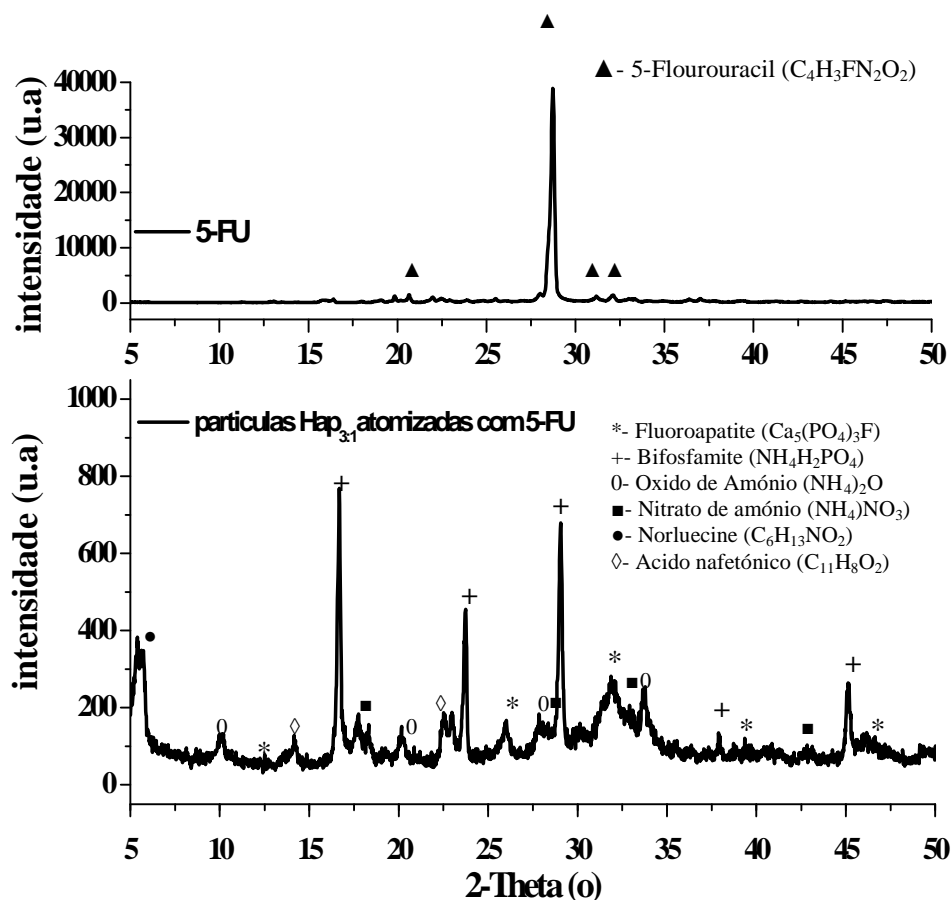


Figura 55- Difractograma de raios X correspondente (a) ao 5-FU e (b) às partículas atomizadas com 5-FU;

O espectro de FTIR das partículas atomizadas apresenta-se na Figura 56. Observam-se bandas a 472, 602, 962, 1034 e 1087 cm^{-1} correspondentes à vibração do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$, uma banda relativa à vibração do grupo OH^- a 3450 cm^{-1} e a banda do grupo funcional NH a 3150 cm^{-1} [43, 154]. Além destas, observam-se também a 545, 662, 1386 e 1406 cm^{-1} as bandas correspondentes à vibração (N-H) [154]. O pico a 743 cm^{-1} que pode ser atribuído à ligação OH-F , é característico de uma fluoroapatite [154], observação esta concordante com os resultados de DRX que evidenciam a presença de fluoroapatite nas partículas atomizadas.

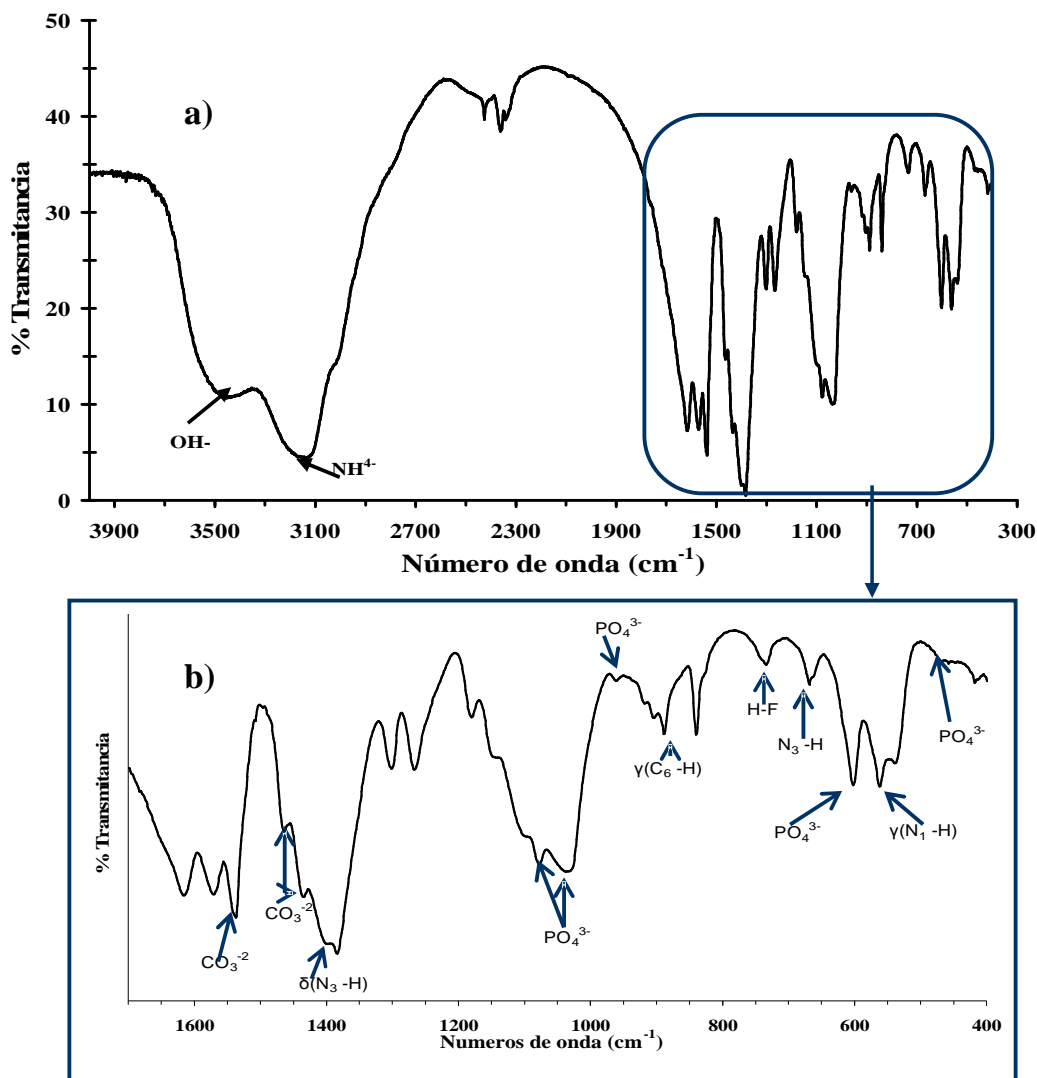


Figura 56-(a) Espectro de FTIR completo das partículas após o processo de atomização; (b) ampliação do espectro de FTIR para número de onda entre 400 e 1600 cm^{-1}

A Figura 57, ilustra a morfologia das partículas obtidas. Observa-se que algumas partículas apresentam uma morfologia semelhante à de donuts. Porém o tamanho dessas partículas é inferior ao das obtidas por atomização de suspensões aquosas simples das nanopartículas Hap_{3:1} (secção 3.1.2, Figura 18). A semelhança de morfologias sugere que os referidos donuts poderão corresponder à fluoroapatite. De acordo com a literatura a morfologia dos cristais de fluoroapatite é variada e altamente sensível à concentração de flúor utilizado na sua preparação, podendo incluir desde prismas hexagonais alongados até formas esféricas [155]. Tal como já se referiu o 5-FU é uma molécula orgânica que possui um átomo de

flúor ligado a um anel. Sabe-se que os iões flúor podem ser facilmente incorporados na estrutura da hidroxiapatite (por substituição dos grupos OH) e assim dar lugar à fluoroapatite [155]. Segundo a literatura é possível que uma parte dos iões OH⁻ existentes nos planos ac, bc e ab da hidroxiapatite seja substituída por iões flúor, devido ao facto do raio do ião F⁻ ser muito próximo do OH⁻, 0,133nm e 0,137nm, respectivamente [2]. No sistema em estudo, atendendo ao valor da temperatura de trabalho (180°C) presume-se que a molécula de 5-FU se decompõe durante o processo de atomização propiciando a reacção do ião F⁻ com a hidroxiapatite formando assim a fluoroapatite.

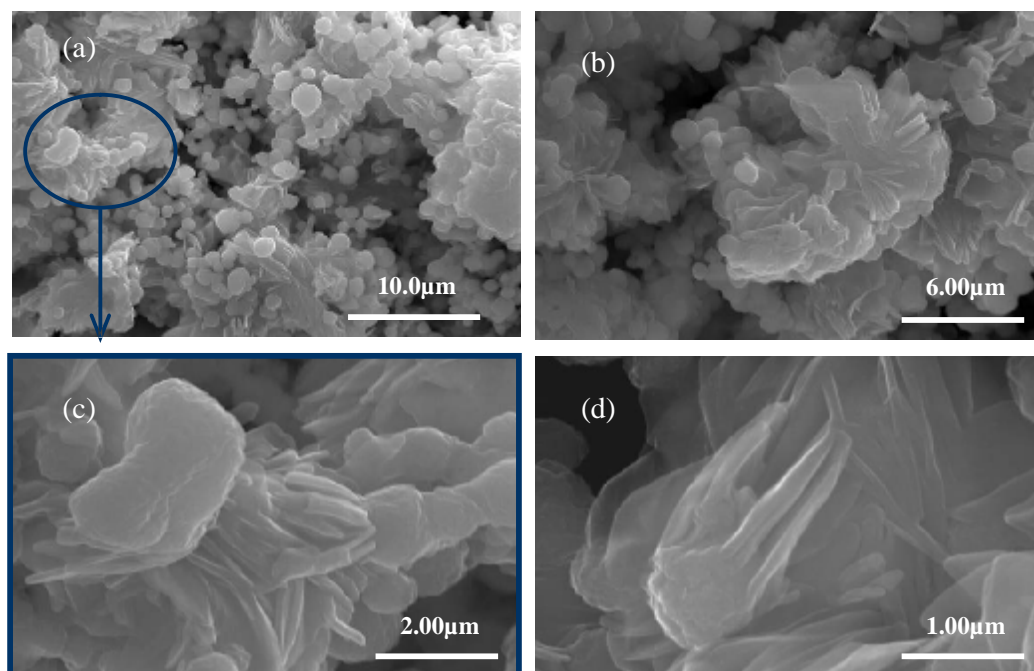


Figura 57- Imagens de SEM das partículas Hap_{3:1} atomizadas com 5-FU. A imagem (c) corresponde a uma amplificação da zona assinalada em (a).

Na Figura 57 para além das partículas com morfologia de donuts observa-se que existem também partículas com outras morfologias, que poderão corresponder a outras fases cristalinas, nomeadamente o óxido de amónio, a bifosfamite e o nitrato de amónio.

Este processo de preparação não garante assim a integridade da molécula de fármaco. De facto esta situação não era esperada atendendo a que a análise térmica do composto 5-FU isolado (Figura 58), revela que este só se decompõe a temperaturas superiores à utilizada no presente processo de atomização.

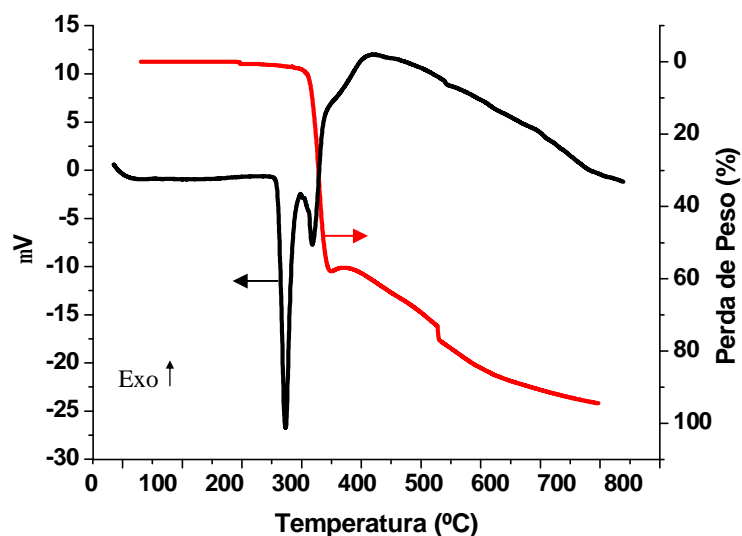


Figura 58- ATD/ATG do composto 5-FU

Se a integridade da molécula do fármaco fosse salvaguardada, o método teria vantagem de permitir uma preparação do suporte relativamente rápida quando comparada com o processo analisado e discutido anteriormente, em que são necessárias 120 horas de tempo de adsorção do fármaco. É possível que uma optimização das condições processuais de atomização possibilite, a temperaturas inferiores às usadas, a preparação de grânulos com moléculas de fármaco 5-FU ligadas à sua superfície.

Em conclusão o presente capítulo dedicou-se ao estudo da adsorção do fármaco 5-FU em partículas e grânulos com características diferentes. Observou-se que a estados de superfície diferentes corresponderam diferentes capacidades adsortivas do fármaco. Neste capítulo avaliou-se ainda a possibilidade de preparação de um suporte de fármaco por atomização de suspensões de nanopartículas de hidroxiapatite em 5-Flourouracil. Concluiu-se porém que, à temperatura actual de trabalho, a molécula do fármaco se degrada pelo que se deverão explorar outras condições de atomização que obviem este problema. Refira-se no entanto que os presentes resultados apontam a possibilidade de se usar a atomização para preparação de fluoroapatite a partir de nanopartículas de hidroxiapatite.

Para os estudos de libertação do fármaco 5-FU cujos resultados serão apresentados no capítulo que se segue, do lote de materiais preparados seleccionaram-se os grânulos Gra_{3:1} e os grânulos Gra_{3:1 800} por forma a dispor-se de materiais com diferente porosidade,

diferentes fases cristalinas e diferentes estados de superfície e assim avaliar a relevância destes parâmetros na liberação do fármaco.

5. Estudos de liberação do 5-Flourouracil

5.1.Libertação do 5-FU dos grânulos Gra_{3:1}

A Figura 59 (-a) mostra a quantidade de 5-flourouracil libertada por grânulos Gra_{3:1} em

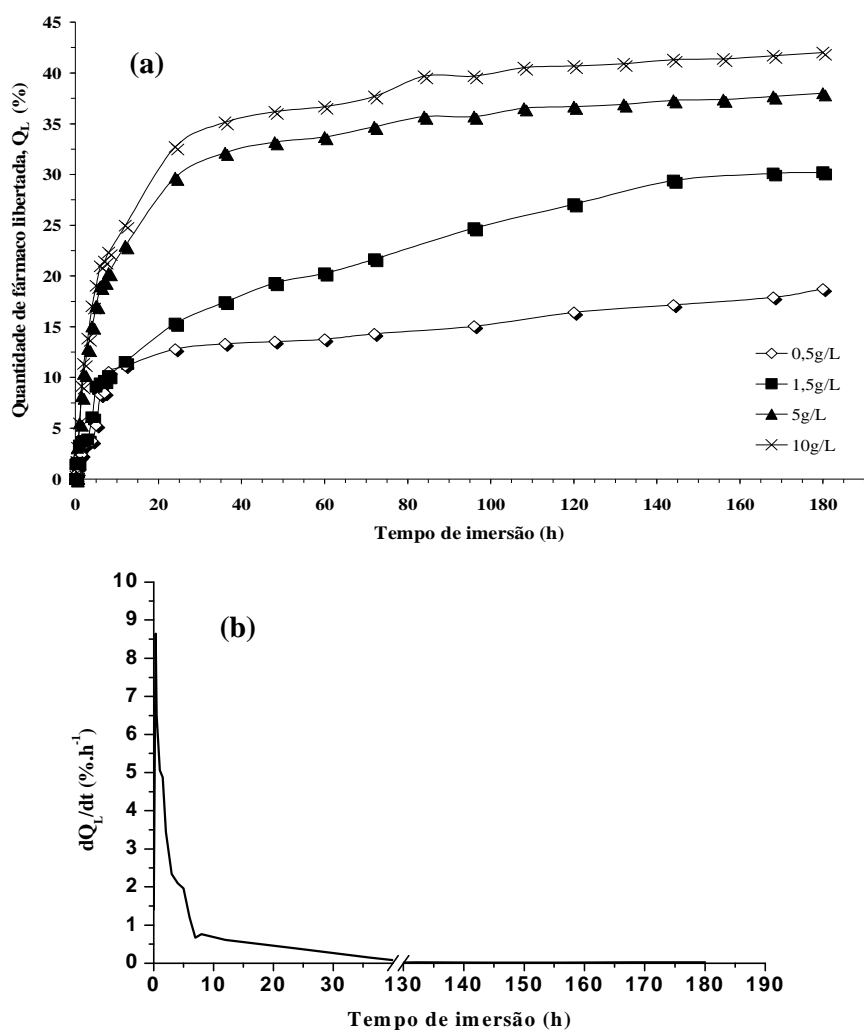


Figura 59- a) Variação da quantidade de 5-FU libertada por grânulos com o tempo de liberação para diferentes concentrações iniciais de fármaco na solução de carregamento: (-◇-) 0,5g/L; (-■-) 1,5 g/L; (-▲-) 5g/L; (-×-) 10g/L; (b) velocidade de liberação do fármaco 5-FU por grânulos em função do tempo de imersão, correspondente à concentração inicial de 5g/L.

função do tempo de libertação, expressa como percentagem da quantidade de fármaco inicialmente adsorvida pelos grânulos. Os ensaios de libertação foram realizados numa solução tampão de fosfatos a pH=7,4 e a 37°C. Observa-se que as diferentes amostras carregadas com diferentes teores de fármaco apresentam três estágios de libertação: um estágio inicial de libertação rápida seguido de um segundo estágio de libertação mais lenta e, finalmente, um ultimo estágio em que a velocidade de libertação é muito lenta, praticamente nula. Este comportamento, comum às varias amostras carregadas em soluções com diferentes concentrações de 5-FU (0,5; 1,5; 5 e 10g/L) está tipificado pela derivada da curva de libertação correspondente à concentração de 5 g/L (Figura 59(-b)). A Figura 59(-a) mostra também que a quantidade de 5-FU libertada é tanto maior quanto mais elevado for o carregamento dos grânulos, isto é, quanto maior a quantidade de fármaco adsorvida nos grânulos, maior é a quantidade libertada.

Selecionou-se a concentração de 5-Fluorouracil de 5g/L para aprofundar o estudo do processo de libertação de 5-FU pelos grânulos Gra_{3:1} com o tempo de libertação numa solução tampão de fosfatos.

A Figura 60 ilustra a variação da concentração do cálcio (Figura 60 (a)) e do fósforo (Figura 60-(b)) na solução de libertação, com o decorrer da libertação do 5-FU e para um determinado teor inicial de fármaco adsorvido (obtido após carregamento numa solução com 5g/L de 5-FU). Observa-se uma certa diminuição da concentração de fósforo, mais acentuada no primeiro dia, acompanhada por um aumento global do teor de cálcio em solução. Convertendo as variações mássicas expressas pela Figura 40 nas equivalentes

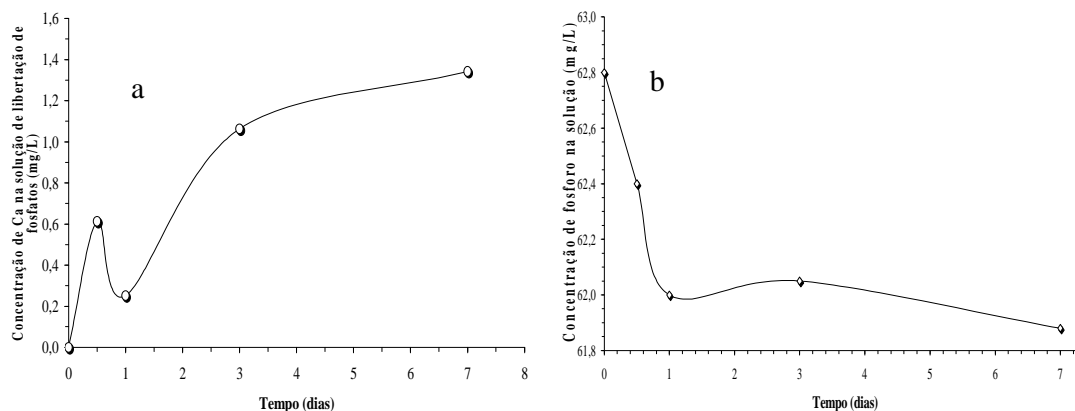


Figura 60- Variação da concentração do cálcio (a) e do fósforo (b) na solução de libertação, durante os primeiros sete dias de libertação do 5-FU

variações molares, constata-se que a uma subtração global de $\sim 0,026$ mM/L de fósforo da solução corresponde um enriquecimento da mesma em cerca de $\sim 0,029$ mM/L de cálcio, tratando-se assim de variações molares com a mesma ordem de grandeza. Usando os gráficos das Figura 36 e Figura 59 podemos estimar a quantidade molar de 5-FU libertada na mesma solução e ao fim do mesmo período (7 dias) através do cálculo

$$20\% \times (0,5 \text{ mole de 5-FU} / \text{g de Gra}_{3:1}) \times (50 \times 10^{-3} \text{ de Gra}_{3:1} / 0,1 \text{ L solução libertada})$$

obtendo-se o valor 0,05mM de 5-FU/L solução de libertação. Para a interpretação dos presentes resultados sugere-se a seguinte ideia: partindo do pressuposto de que as moléculas de fármaco estão adsorvidas em locais Ca^{2+} da superfície ($\text{Ca}^{2+}_{\text{sup}}$) dos grânulos de Hap, a desorção das moléculas de 5-FU liberta os referidos locais que ficam aptos para adsorver novas espécies da solução envolvente, nomeadamente os iões fosfato, ocasionando assim a diminuição da concentração de fósforo da solução. O facto de a solução de libertação evidenciar um enriquecimento em cálcio aponta no sentido de a desorção do fármaco ser acompanhada pela saída de algum cálcio da superfície dos grânulos, possivelmente ligado à molécula de fármaco. Segundo este raciocínio, a diferença entre as quantidades de fármaco e de cálcio libertadas seria uma medida da quantidade de locais activos $\text{Ca}^{2+}_{\text{sup}}$ libertados, aptos a adsorver fosfatos, ou seja, da quantidade de fosfato subtraído à solução. Os valores atrás calculados suportam aceitavelmente bem esta ideia.

Complementarmente a análise das curvas de mobilidade electroforética dos grânulos permite verificar que para o pH de 7.4 a que decorrem os ensaios de libertação, e após 24 horas de libertação, a carga superficial dos grânulos torna-se mais negativa o que sugere que a superfície adquire novas espécies negativas que neste caso seriam possivelmente os grupos fosfatos. Após esse período de tempo a análise da Figura 61 mostra que nas condições do ensaio (pH=7.4) as alterações posteriores de carga superficial são muito menos significativas. Este comportamento parece estar relacionado com a quantidade de 5-FU libertada que decai significativamente após o primeiro dia, tal como documentado na Figura 59.

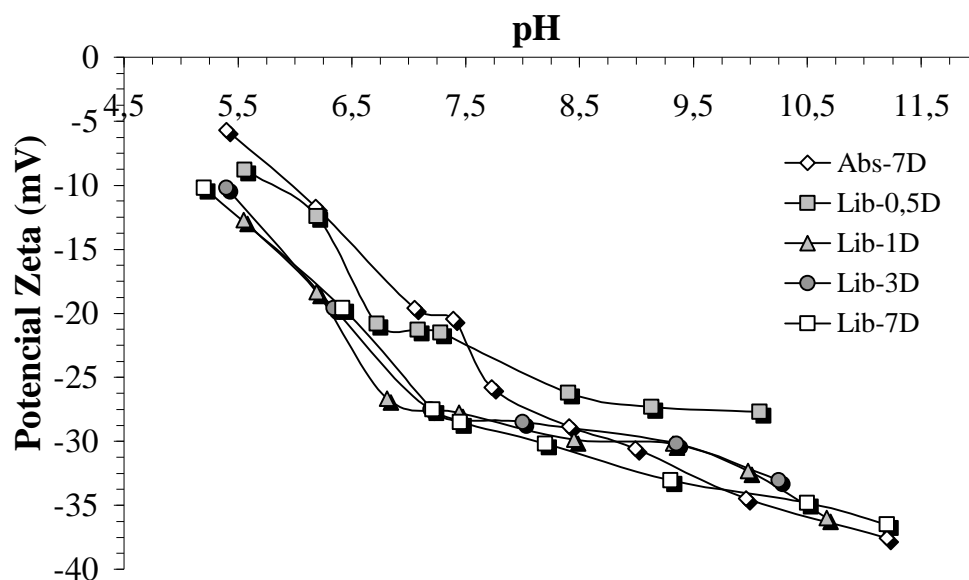


Figura 61- Variação do potencial zeta com o pH para os grânulos após: 7dias de adsorção (-◇-) e após diferentes períodos de liberação: (-■-) doze horas; (-▲-) um dia; (-●-) três dias e (-□-) sete dias;

5.2.Características dos grânulos Gra_{3:1} após liberação

Na Figura 62 são apresentados os difractogramas de raios-X (DRX) dos grânulos obtidos após diferentes tempos de liberação do 5-FU. Não são visíveis alterações significativas no perfil dos picos, concluindo-se assim que a hidroxiapatite é a fase cristalina presente em todos eles.

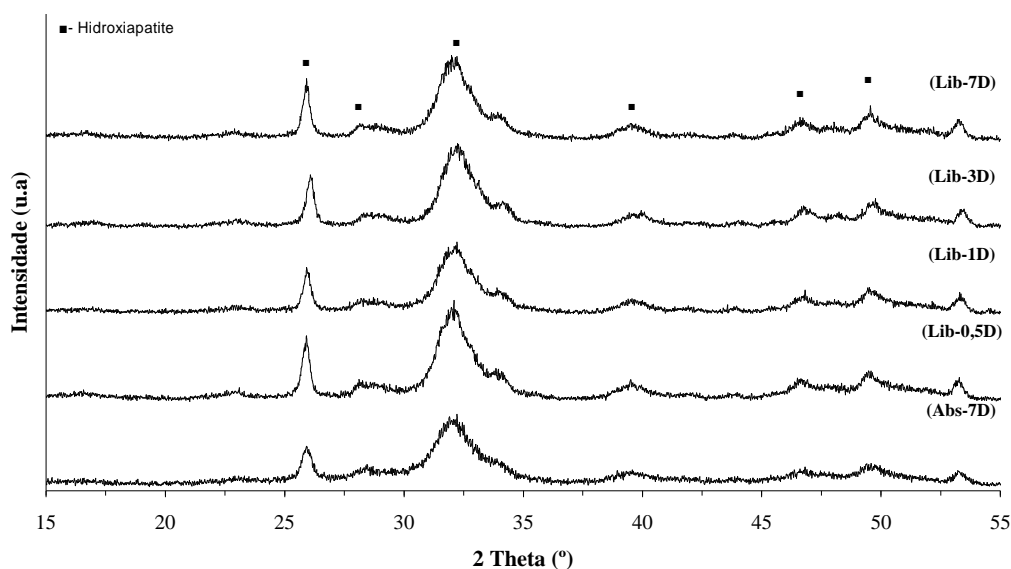


Figura 62- Difrração de RX dos grânulos após o carregamento do fármaco e após diferentes dias na solução de libertação do 5-FU.

As características morfológicas exibidas pelos grânulos após diferentes tempos de imersão na solução de libertação estão ilustradas na Figura 63. Observa-se que, após diferentes períodos de libertação, os grânulos não evidenciam alterações de morfologia significativas. Esta manutenção de morfologia indica que os grânulos, constituídos por agregados de

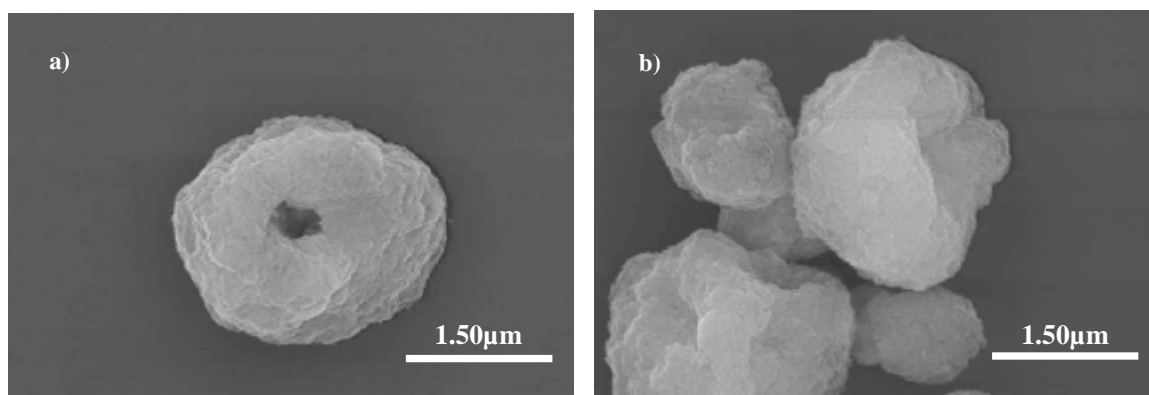


Figura 63- Imagens de SEM dos grânulos após: (a) meio-dia de libertação e (b) 7 dias.

nanopartículas de Hap, não se desagregaram após permanência prolongada em diferentes soluções (tempo de carregamento seguido do tempo de libertação). Esta manutenção de morfologia pode ser interessante, pois segundo a literatura este tipo de configuração é adequada para ser usada em implantes devido às suas características específicas de

empacotamento, ao facto de não provocar reacções inflamatórias [40]. A desagregação dos grânulos poderia, por outro lado, causar inconvenientes: as partículas de dimensões muito reduzidas poderiam ser levadas pela corrente sanguínea e ficar retidas em outros órgão do corpo humano com consequências indesejadas, como por exemplo obstrução de veias ou artérias [40].

5.3.Efeitos da composição do meio no processo de libertação do 5-FU

Realizaram-se estudos *in vitro* usando grânulos Gra_{3,1} e duas soluções tampão de fosfatos com forças iónicas diferentes (0M e 0,145 M de NaCl) a pH=7,4 e a 37°C. Os resultados obtidos estão graficamente apresentados na Figura 64 que mostra a variação com o tempo da percentagem de fármaco 5-FU libertado numa solução tampão de fosfatos simples e numa solução tampão de fosfatos com NaCl. Da análise da Figura 64 verifica-se que a percentagem total de 5-FU libertada pelos grânulos é de 45% quando os testes são realizados numa solução de fosfatos isenta de NaCl e de 41% quando a força iónica da solução é de 0,145M. Por outro lado a própria velocidade de libertação do fármaco parece ser condicionada pela força iónica do meio. Este facto está claramente ilustrado na Figura

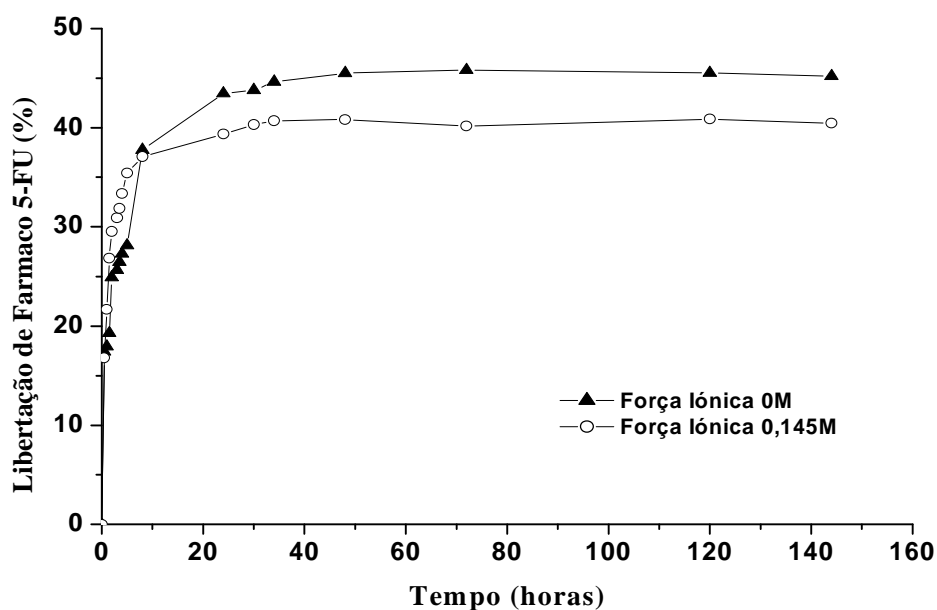


Figura 64- Variação da percentagem de fármaco 5-FU libertado de grânulos com o tempo de imersão para (-□-) uma solução de força iónica 0M e (-◇-) uma solução de força iónica de 0,145M

65 onde se apresentam as velocidades de libertação do 5-FU em função do tempo: enquanto na solução isenta de NaCl se observa, desde o instante inicial, uma desaceleração gradual da taxa de libertação do fármaco, no meio de força iónica 0,145M ao primeiro máximo inicialmente observado segue-se um segundo máximo relativo ao fim de ~2 horas.

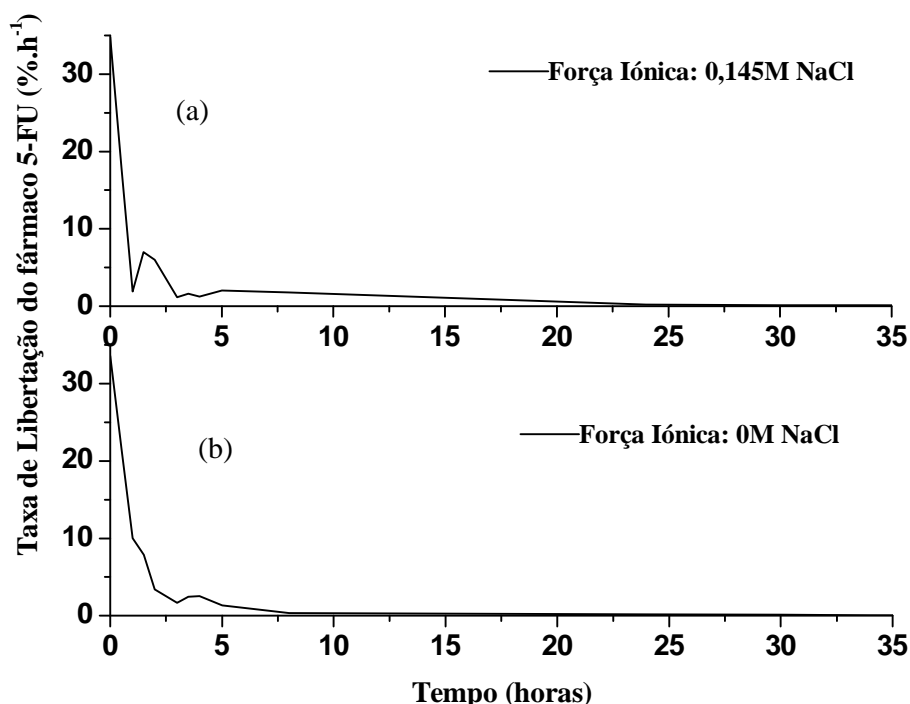


Figura 65- Curva derivada da percentagem de libertação do 5-FU com o tempo de imersão para (a) força iónica 0.145M e para (b) para força iónica de 0M.

Este comportamento parece indicar a existência de dois períodos consecutivos de elevada taxa de libertação de fármaco induzidos pela adição de NaCl ao meio de libertação.

Tal como já se referiu, anteriormente, as moléculas de 5-FU adsorvem preferencialmente nos locais positivos da superfície dos grânulos. Quando os grânulos são colocados numa solução de libertação, o 5-FU é libertado para a solução deixando momentaneamente livres alguns locais com carga positiva ($\text{Ca}^{2+}_{\text{sup}}$). Na presença de iões Na^+ e Cl^- existentes na solução de libertação, os iões Cl^- poderão disputar com os iões fosfato os locais deixados disponíveis pelas moléculas de 5-FU. Durante este processo deve também ocorrer a adsorção de iões Na^+ à superfície dos grânulos visto que estes apresentam carga global negativa, mesmo após 7 dias de libertação. Estes diversos processos de interacção

envolvendo o 5-FU, os locais de adsorção nos grânulos e os íons da solução serão pois responsáveis pelas diferenças entre as duas curvas de libertação, evidenciando assim que a composição do meio de libertação do fármaco pode alterar o perfil de libertação do mesmo. É por conseguinte expectável que o perfil de libertação deste fármaco, *in vivo*, se registado, se apresente completamente alterado, o que aponta como mandatorio a realização de estudos *in vivo* para caracterizar a libertação deste fármaco.

Nos DRX dos grânulos obtidos após os 7 dias de libertação em meios de força iónica diferente (0M e 0,145M em NaCl), detecta-se uma única fase cristalina que corresponde á hidroxiapatite (Figura 66). Refira-se no entanto que se observa um ligeiro incremento de cristalinidade nos grânulos que permaneceram na solução de fosfatos de força iónica superior (0,145M), Figura 66-b, facto este indiciado pela maior definição dos picos de difracção de RX (aumento de intensidade e diminuição de largura a meia altura).

Estes resultados sugerem que á medida que decorre o processo de libertação de 5-Flourouracil pelos grânulos de hidroxiapatite, em soluções tampão de fosfatos e na presença de íons Na^+ e Cl^- , ocorrem em simultâneo dois processos: o de libertação do fármaco e um outro, possivelmente de dissolução/ reprecipitação local. Segundo alguns autores podem ocorrer mecanismos de dissolução do fosfato de cálcio amorfo seguidos de nucleação de Hap cristalina e segundo outros a cristalização de fosfato de cálcio amorfo pode ocorrer por processos internos de rearranjo [29, 156]. A comprovação do mecanismo de dissolução e reprecipitação e/ou de rearranjo interno poderá ser suportada pela monitorização da variação da concentração do cálcio em solução em estudos futuros.

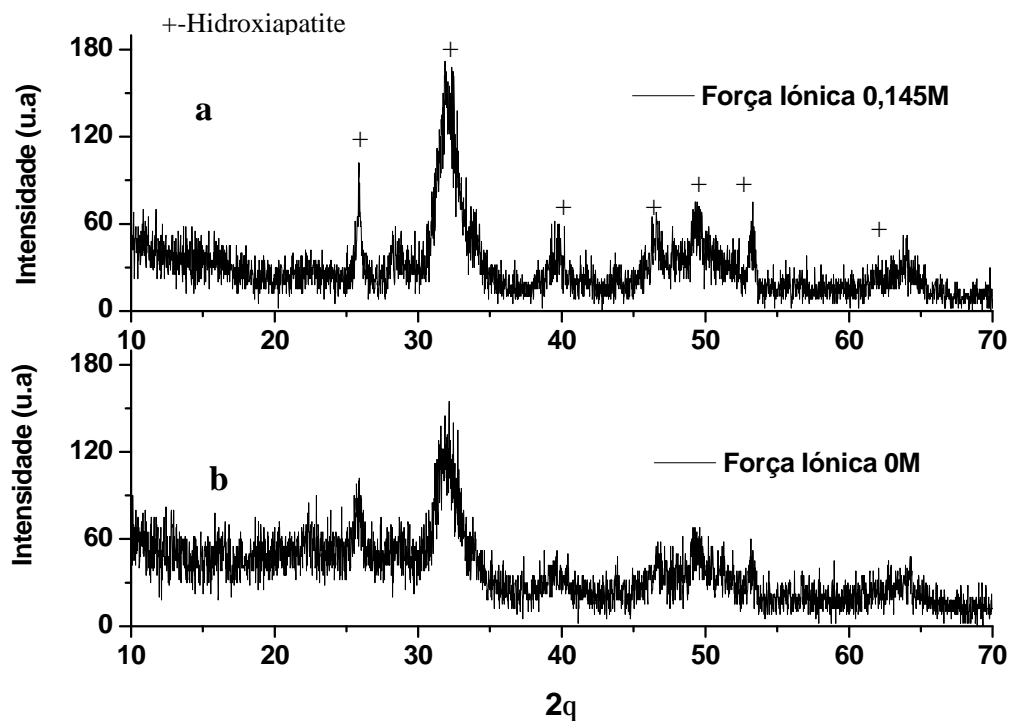


Figura 66- Difração de RX dos grânulos após libertação numa solução tampão de fosfatos de: (a) força iónica 0,145M e (b) força iónica 0M.

5.4.Libertação do 5-FU por grânulos tratados termicamente a 800°C

Os resultados obtidos no estudo da libertação do fármaco adsorvido nos grânulos tratados termicamente estão representados na Figura 67. Os ensaios de libertação foram conduzidos numa solução tampão de fosfatos a pH 7.4 e a 37°C. A comparação do comportamento dos grânulos, com e sem tratamento térmico, mostra que a quantidade total de fármaco libertada no primeiro caso (~9 $\mu\text{moles/L}$) é claramente inferior à observada no segundo caso (~30 $\mu\text{moles/L}$).

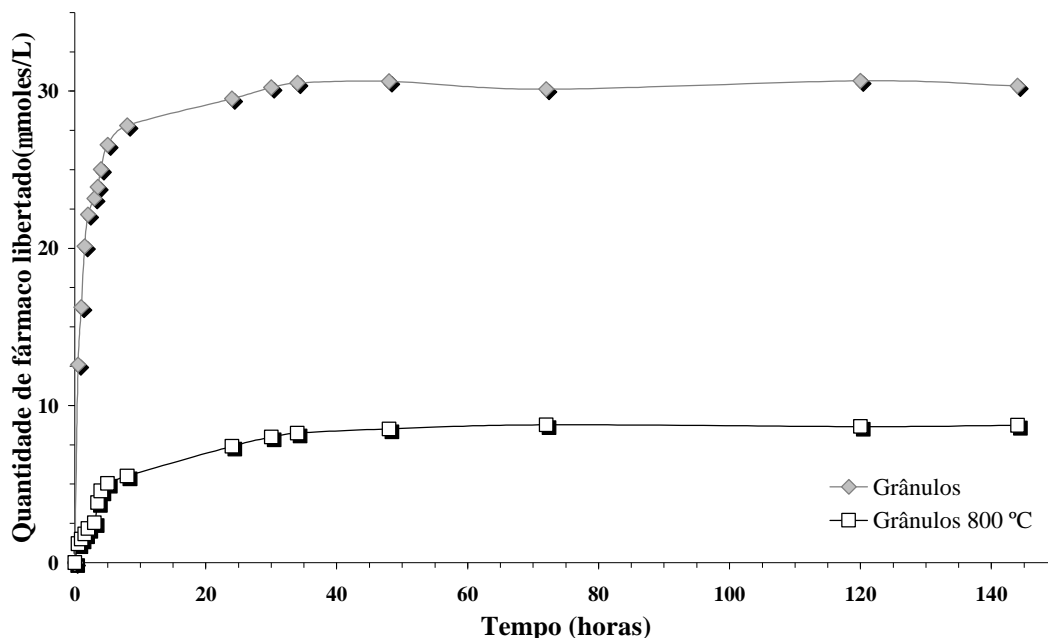


Figura 67- Variação da percentagem de fármaco libertado em função do tempo de libertação para: (-◇-) grânulos e (-□-) grânulos tratados termicamente a 800°C

Por outro lado o tratamento térmico dos grânulos parece condicionar a velocidade de libertação do fármaco, como se pode observar na Figura 68, onde se apresentam as taxas de libertação do fármaco para os dois tipos de grânulos. Observa-se que a taxa de

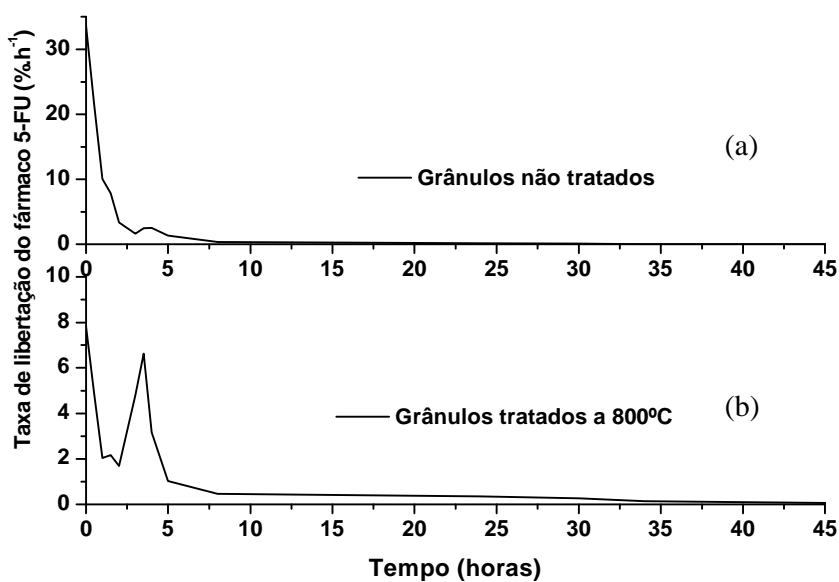


Figura 68- Variação da velocidade de libertação do fármaco com o tempo de libertação para: (a) grânulos e (b) grânulos tratados termicamente a 800°C

libertação que caracteriza os grânulos tratados a 800°C, apresenta dois máximos, um nos instantes iniciais e o segundo por volta das 4 horas, ao passo que no caso dos grânulos não tratados a taxa de libertação do fármaco 5-FU vai gradualmente desacelerando.

Atendendo a que, como já anteriormente analisado e discutido, o tratamento térmico dos grânulos induziu o aparecimento de uma nova fase cristalina, o β -TCP, e tendo em consideração que esta fase é mais solúvel do que a hidroxiapatite [157] avaliou-se o efeito do processo de libertação do fármaco na composição de fases das amostras. A Figura 69 e Figura 70 possibilitam essa avaliação. Observa-se que, no caso dos grânulos não tratados, não ocorrem alterações na composição de fases cristalinas (Figura 69-a e b) embora seja claramente visível uma diminuição de intensidade dos picos da única fase cristalina presente (hidroxiapatite). No que se refere aos grânulos tratados termicamente a 800°C (Figura 70-a e b), uma das duas fases cristalinas presentes, a hidroxiapatite, deixa de ser detectada no DRX, observando-se apenas os picos de difracção correspondentes ao β -TCP que evidenciam uma diminuição de intensidade. Estes resultados apontam para a dissolução de uma das fases presentes nos grânulos tratados termicamente, a HAP, o que não se coaduna com os comportamentos referenciados na literatura segundo os quais o β -TCP seria a fase a dissolver-se preferencialmente [15].

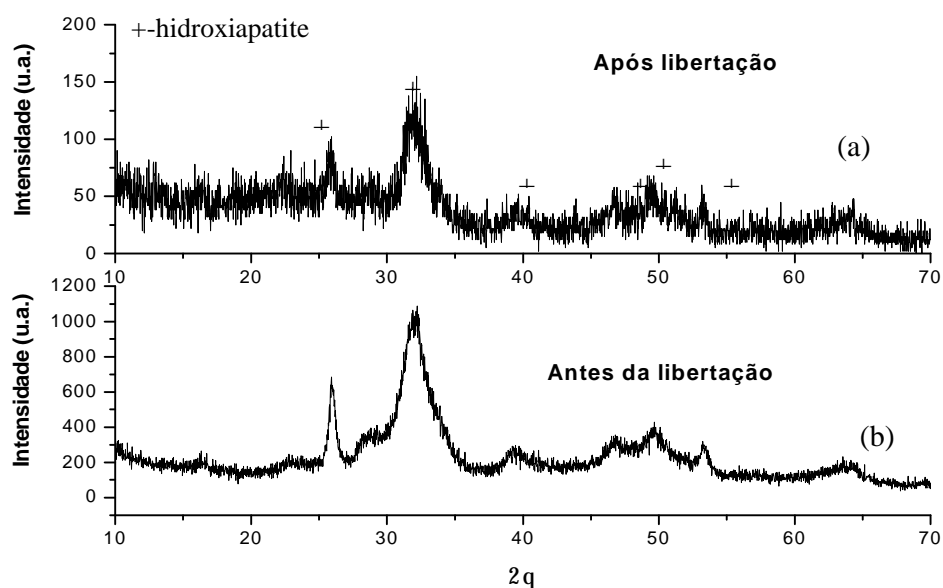


Figura 69- Difracção de RX dos grânulos: (a) antes do processo de libertação, (b) após o processo de libertação numa solução tampão de fosfatos

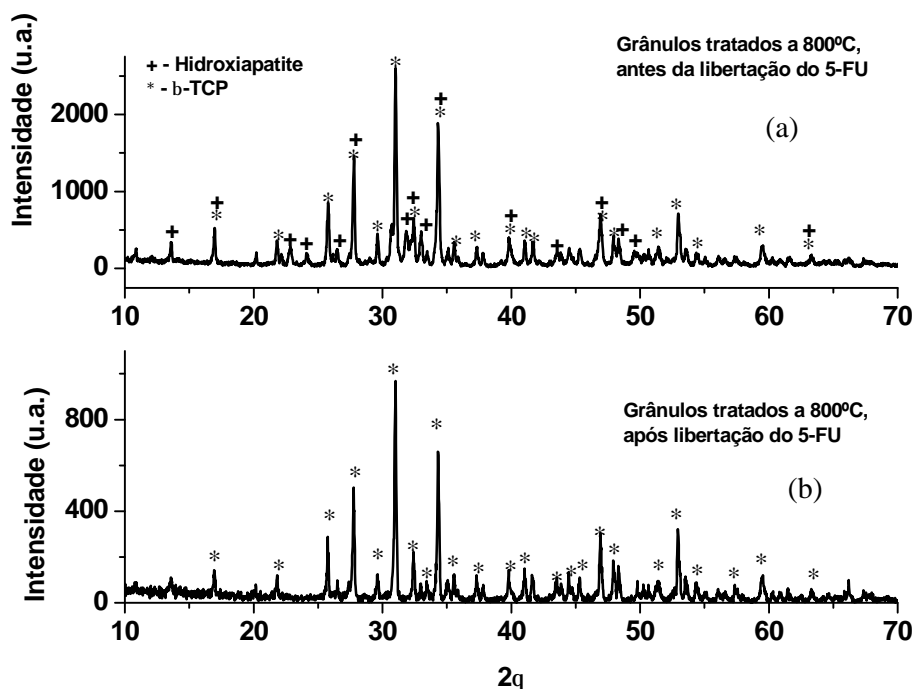


Figura 70- Difrração de RX dos granulos tratados termicamente a 800°C: (a) antes do processo de liberação; (b) após o processo de liberação numa solução de fosfatos

Na Figura 71 são apresentadas as imagens de SEM dos grânulos após 7 dias de imersão numa solução de liberação. Comparando a morfologia dos grânulos Gra_{3,1}, com e sem tratamento térmico (Figura 71- b e a, respectivamente), e tendo como referência a morfologia dos mesmos grânulos antes do início da liberação (Figura 26-a e f,

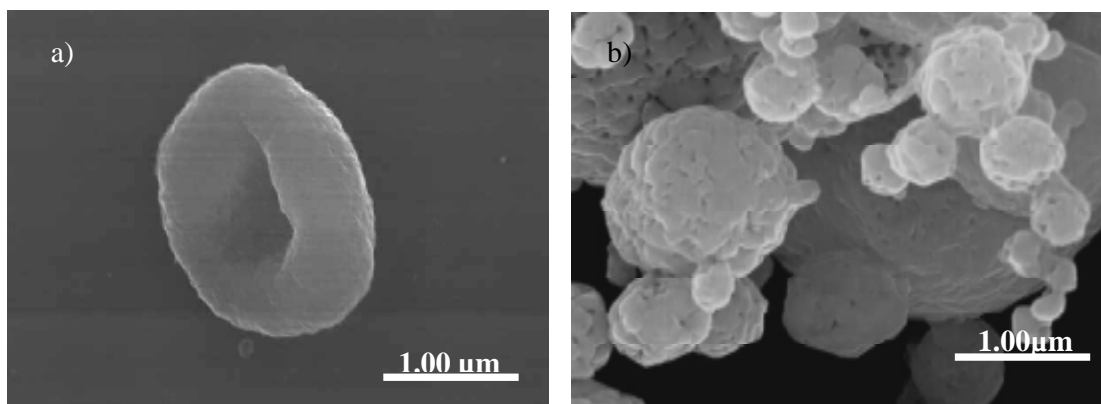


Figura 71- (a) Grânulos Gra_{3,1} após 7 dias de liberação tal qual preparados e (b) grânulos tratados termicamente a 800°C

respectivamente) verifica-se que apenas no caso dos grânulos submetidos a 800°C ocorrem alterações visíveis na microestrutura que parecem indicar perda de material. Conjugando estes dados com a informação fornecida pelos difractogramas de RX dos dois tipos de grânulos, conclui-se que a referida perda de material se deve presumivelmente à dissolução da hidroxiapatite. Estes resultados, algo surpreendentes, podem ser vantajosos no campo das aplicações biomédicas visto que a fase que parece permanecer mais tempo sem se dissolver é o β -TCP e, segundo a literatura, esta fase tem a particularidade de possuir a capacidade de atrair os osteoblastos e assim contribuir para uma formação mais rápida do tecido ósseo [158].

Têm sido realizados diversos estudos de libertação de variadas substâncias com materiais bifásicos, isto é, misturas de Hap e β -TCP, *in vitro* e/ou em meios celulares [119, 121, 122]. Os resultados obtidos na caracterização do comportamento libertador do material bifásico e da sua eficácia antibacteriana revelaram-se por vezes contraditórios, denotando o efeito das diferentes condições experimentais usadas. Constata-se pois que, para se atingir a percepção real dos fenómenos que ocorrem na etapa de libertação de um fármaco é indispensável controlar-se com rigor as condições de libertação, e posteriormente recorrer a estudos *in vivo* por forma a avaliar efeitos dos variadíssimos factores que no corpo no corpo humano podem interferir de forma decisiva nos processos de libertação, inibindo-os ou acelerando-os. Embora tais estudos não figurassem como objectivo do presente trabalho, eles afiguram-se um complemento incontornável para melhor caracterizar o perfil de libertação do fármaco em análise.

Os resultados apresentados e discutidos no presente capítulo permitem concluir que a quantidade de fármaco libertado bem como a sua taxa de libertação podem ser controlados através da manipulação das características dos grânulos, nomeadamente área superficial/porosidade, composição de fases cristalinas e estado de superfície. Aos efeitos destes parâmetros somam-se ainda os efeitos da composição química de próprio meio de libertação, pois esta, ao condicionar os processos de adsorção/desorção na superfície do suporte libertado, interfere na desorção do fármaco modificando o seu perfil de libertação. No presente caso, as alterações do meio reflectem-se ainda em alterações de cristalinidade do material suporte.

Capítulo 4 – Conclusões Gerais

No presente trabalho estudou-se a viabilidade de grânulos fosfocálcicos para aplicações como sistema de libertação do fármaco 5-FU, estudo este que compreendeu fundamentalmente as seguintes fases: (i) a precipitação de partículas de hidroxiapatite e sua atomização na forma de grânulos, (ii) a caracterização do comportamento adsorptivo dos grânulos relativamente ao fármaco 5-FU e por fim (iii) a caracterização do processo de libertação do mesmo fármaco, *in vitro*.

Na etapa de preparação de materiais produziram-se partículas nano e micrométricas de hidroxiapatite por precipitação, grânulos de hidroxiapatite por atomização e, por tratamento térmico destes, grânulos bifásicos de β -TCP e Hap. Os resultados obtidos permitiram identificar a importância de algumas condições experimentais subjacentes à precipitação das partículas, designadamente o pH e a presença de citratos no meio precipitante, não só no condicionamento da morfologia das partículas e grânulos mas também na determinação do estado de superfície das partículas e grânulos. Efectivamente os materiais produzidos no presente trabalho apresentam citratos adsorvidos que influenciam o comportamento adsorptivo face ao 5-FU, ou seja, diminuem a capacidade adsorptiva do material por ocuparem locais de superfície adequados à adsorção do fármaco. Este facto ficou claramente patenteado pelo aumento da capacidade adsorptiva dos grânulos induzida pelo tratamento térmico dos mesmos a uma temperatura elevada, suficiente para decompor termicamente os citratos adsorptivos, eliminando-os. A caracterização do processo de adsorção do fármaco permitiu identificar um modelo matemático que quantifica adequadamente o fármaco adsorvido em função do tempo (modelo de pseudo segunda ordem), possibilitando assim a selecção das condições de carregamento necessárias (concentração do fármaco em solução e tempo de adsorção) para se obter um determinado teor de fármaco adsorvido. O facto de os grânulos possuírem citratos adsorvidos não conferiu heterogeneidade energética significativa aos locais de adsorção da superfície dos grânulos, pois a aplicabilidade da isotérmica de Langmuir aos dados de equilíbrio foi claramente observada. Por outro lado, observou-se que, em paralelo com a adsorção do 5-FU, ocorre a desorção dos citratos, libertando locais que são ocupados pelas moléculas do fármaco. Estes processos de adsorção/ desorção parecem no entanto condicionados pela configuração do ião citrato que, sendo fortemente dependente do pH do meio, pode explicar a variabilidade da capacidade adsorptiva do fármaco com o pH da solução de 5-FU.

O estudo do processo de liberação do fármaco mostrou que, embora a desorção do 5-FU seja acompanhada pela perda de algum cálcio para o meio de liberação no caso dos grânulos de hidroxiapatite, o processo parece ser mais complexo nos grânulos bifásicos dada a aparente solubilização de uma das fases cristalinas (a hidroxiapatite) em detrimento da outra (o β -TCP). Esta diversidade de processos é também acompanhada de velocidades de liberação do fármaco distintas, apontando assim para a possibilidade de se controlar a velocidade de desorção do 5-FU através da escolha da composição de fases cristalinas do sistema libertador. Os efeitos da composição química do meio de liberação de, fármaco no teor e velocidade de liberação do fármaco evidenciaram a necessidade de estudos complementares visando a caracterização do comportamento dos actuais sistemas de liberação em meios celulares e, posteriormente, *in vivo*, que se afiguram indispensáveis para definir o verdadeiro perfil de liberação do fármaco em análise.

Capítulo 5 - Bibliografía



Bibliografía

- [1] A.V.Gothoskar, A.M.Joshi, and N.H.Joshi; "Pulsatile Drug Delivery Systems: A Review", *Drug Delivery Technology*, (2004), 1-11.
- [2] Hidekazu Tanaka, Akemi Yasukawa, Kazuhiko Kandori, and Tatsuo Ishikawa; "Surface structure and properties of fluoridated calcium hydroxyapatite", *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 204, (2002), 251-259.
- [3] Dieter Lohmann; "Controlled Release-Recent Progress in Polymeric drug delivery systems", *Macromol. Symp.*, Vol. 100, (1995), 25-30.
- [4] Omathanu Pillai and Anand Babu Dhanikula and Ramesh Panchagnula; "Drug Delivery: an odyssey of 100 years", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 5, (2001), 439-446.
- [5] Omathanu Pillai and Ramesh Panchagnula; "Polymers in drug delivery", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 5, (2001), 447-451.
- [6] Xiao Huang and Christopher S.Brazel; "On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems", *Journal of Controlled Release*, Vol. 73, (2001), 121-136.
- [7] Willi Paul and Chandra P.Sharma; "Ceramic Drug Delivery: A Perspective", *Journal of Biomaterials applications*, Vol. 17, (2003), 253-263.
- [8] Genin, Fran.celilla.ios Y., Luo, Ping, Dash, and Alekha K.; "Hydroxyapatite based drug delivery implant for cancer treatment", *US patent 6 767 550*, (2004),
- [9] Jörg Michael Schierholz; "Drug delivery devices to enhance performance and improve outcome", *dds&s*, Vol. 1, 2, (2001), 52-56.
- [10] A.Šłóarczyk, J.Szymura-Oleksiak, and B.Mycek; "The Kinetics of pentoxifylline release from drug-loaded hydroxyapatite implants", *Biomaterials*, Vol. 12, (2000), 1215-1221.
- [11] M.Bohner; "Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements", *Injury, International Journal of the Care of the Injured*, Vol. 31, **S-D**, (2000), 37-47.
- [12] A.A.Baig, J.L.Fox, Z.Wang, W.I.Higuchi, S.C.Miller, A.M.Barry, and M.Otsuka; "Metastable Equilibrium Solubility Behavior of Bone Mineral", *Calcif. Tissue Int*, Vol. 64, (1999), 329-339.

- [13] Wanpeng Cao & Larry L.Hench; "Bioactive Materials", *Ceramics International*, Vol. 22, (1996), 493-507.
- [14] Sergey V.Dorozhkin and Matthias Epple; "Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates", *Angew. Chem. Int.*, Vol. 41, (2002), 3130-3146.
- [15] M.Bohner; "Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery", *J. Eur. Spine*, Vol. 10, S, (2001), 114-121.
- [16] E.Fernández, F.J.Gil, M.P.Ginebra, and J. A. P. F.C.M.Driessens; "Calcium phosphate bone cements for clinical applications", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 10, (1999), 169-176.
- [17] T.V.Thamaraiselvi and S.Rajeswari; "Biological Evaluation of Bioceramic Materials-A Review", *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol. 18, 1, (2004), 9-17.
- [18] A.Cüneyt Tas; "Molten Salt Synthesis of Calcium Hydroxyapatite Whiskers", *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 84, 2, (2001), 295-300.
- [19] Li Yuboa, K.de Groot, J.Dewijn, C.P.A.T.Klein, and S.V.D.Meer; "Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 5, (1994), 326-331.
- [20] Kimiyasu Sato, Toshihiro Kogure, Hayato Iwai, and Junzo Tanaka; "Atomic-Scale {1010} Interfacial Structure in Hydroxyapatite Determined by High-Resolution Transmission Electron Microscopy", *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 85, 12, (2002), 3054-3058.
- [21] S.Zhang and K.E.Gonsalves; "Preparation and Characterization of thermally stable nanohydroxyapatite", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 8, (1997), 25-28.
- [22] P.Luo and T.G.Nieh; "Synthesis of ultrafine hydroxyapatite particles by a spray dry method", *Materials Science and Engineering*, Vol. C3, (1995), 75-78.
- [23] Sylvie Raynaud, Eric Champion, and Didier Bernache-Assollant and Jean-Paul Laval; "Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry", *Journal American Ceramic Soc.*, Vol. 84, (2001), 359-366.
- [24] L.Calderin and M.J.Stott; "Electronic and crystallographic structure of apatite", *Physical Review B*, Vol. 67, 134106-1, (2003), 134106-7.
- [25] N.Rangavittal, A.R.Landa-Cánovas, J.M.Gonzalez-Calbet, and M.Vallet-Regi; "Structural study and stability of hydroxyapatite and α -tricalcium phosphate", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, 660, (2000), 668.

- [26] Jong-Shing Bow, Sz-chian Liou, and San-Yuan Chen; "Structural characterization of room-temperature synthesized nano-sized B- tricalcium phosphate", *Biomaterials*, Vol. 25, (2004), 3155-3161.
- [27] J.C.Elliott; "Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates", *Elsevier*, Vol. 18, (1994), 111-116.
- [28] E.Bouyer, F.Gitzhofer, and M.I.Boulos; "Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 11, (2000), 523-531.
- [29] Sujin Kim, Hyun-Seung Ryu, Hyunho Shin, Hyun Suk Jung, and Kug Sun Hong; "In situ of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions", *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 91, (2005), 500-506.
- [30] S.W.K.Kweh, K.A.Khor, and P.Cheang; "The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders", *Journal of Materials Technology*, Vol. 89-90, (1999), 373-377.
- [31] Kiyoshi Itatani, Kengo Iwafune, F.Scott Howell, and Mamoru Aizawa; "Preparation of various calcium-phosphate powders by ultrasonic spray freeze-drying technique", *Materials Research Bulletin*, Vol. 35, (2000), 575-585.
- [32] Cai Shu, Yu Xianzhu, Xiao Zhangying, Xu Guohua, Lv Hong, and Yao Kangde; "Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by gelatin-based precipitation method", *Ceramics International*, (2005), 1-4.
- [33] M.J.Phillips, J.A.Darr, Z.B.Luklinska, and I.Rehman; "Synthesis and characterization of nano-biomaterials with potential osteological applications", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **14**, (2003), 875-882.
- [34] Chen Lai, ShaoQiu Tang, YingJun Wang, and Kun Wei; "Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsions", *Materials Letters*, Vol. 59, (2005), 210-214.
- [35] Xiong Lu, Zhanfeng Zhao, and Yang Leng; "Calcium phosphates crystal growth under controlled atmosphere in electrochemical deposition", *Journal of Crystal Growth*, Vol. 284, (2005), 506-516.
- [36] W.Paul and C.P.Sharma; "Development of porous spherical hydroxyapatite granules:application towards protein delivery", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 10, (1999), 383-388.
- [37] V.S.Komlev, S.M.Barinov, E.girardin, S.Oscarsson, A.Rosengren, F.Rustichelli, and V.P.Orlovskii; "Porous spherical hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite granules:

processing and characterization", *Science and Technology of Advanced Materials*, Vol. 4, (2003), 503-508.

[38] P.Luo and T.G.Nieh; "Preparing hydroxyapatite powders with controlled morphology", *Biomaterials*, Vol. 17, (1996), 1959-1964.

[39] C.C.Ribeiro, C.C.Barrias, and M.A.Barbosa; "Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices", *Biomaterials*, Vol. 25, (2004), 4363-4373.

[40] Willi Paul and Chandra P.Sharma; "Infection resistant hydroxyapatite/alginate plastic composite", *Journal of Materials Science Letters*, Vol. 16, (1997), 2050-2051.

[41] Markus Reinhold, Chistian Horst, and Ulrich Hoffmann; "Experimental and Theoretical investigation of spray dryer with simultaneous chemical reaction", *Chemical Engineering Science*, Vol. 56, (2001), 1657-1665.

[42] K.Masters; "Spray Drying Handbook", *John wiley & Sons Inc. New York.*, **3rd ed.**, (1979),

[43] Ywu-Jang Fu, Shin-Shing Shyu, Fu-Hu Su, and Pih-Chen Yu; "Development of biodegradable co-poly(D, L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 25, (2002), 269-279.

[44] Chrysantha Freitas and Rainer H.Müller; "Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM)", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 46, (1998), 145-151.

[45] Mayumi Asada, Hirokazu Takahashi, Hirokazu Okamoto, Hideo Tanino, and Kazumi Danjo; "Theophylline particle design using chitosan by the spray drying", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 270, (2004), 167-174.

[46] Anna Millqvist-Fureby; "Characterisation of spray-dried emulsions with mixed fat phases", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 31, (2003), 65-79.

[47] bajpai, Praphulla K., Graves, and George A.; "Porous ceramics for controlled release of proteins, polypeptide hormones, and other substances within human and/or other mamillian species and method", *US patent 4 218 255*, (1980),

[48] Duong D.Do; "Fundamentals of Pure Component Adsorption Equilibria", **1**, (1998),

[49] S.J.Gregg and K.S.W.Sing; "Introduction", (1982),

- [50] Ronald Olavo Schwanke; "Determinação da difusibilidade de hidrocarbonetos aromaticos em zeolíticas y por metodos cromatográficos", (2003),
- [51] Claire Fargues and Michel Bailly and Georges Grevillot; "Adsorption of BSA and Hemoglobin on Hydroxyapatite Support: Equilibria and Multicomponent Dynamic Adsorption", *Adsorption*, Vol. 4, (1998), 5-16.
- [52] Ozkan Demirbas, Mahir Alkan, and Mehmet Dogan; "The removal of Victoria Blue from Aqueous Solution by Adsorption on a Low-Cost Material", *Adsorption*, Vol. 8, (2002), 341-349.
- [53] Nikos Spanos, Pavlos G.Klepetsanis, and Petros G.Koutsoukos; "Model studies on the interation of Amino Acids with Biomaterials: The Effect of L-Serine at the Hydroxyapatite -Water Interface", *Journal of Colloids and Interface Science*, Vol. 236, (2001), 2.
- [54] Allal Barroug and Melvin J.Glimcher; "Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro", *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 20, (2002), 274-280.
- [55] D.N.Misra; "Adsorption of potassium N-phenylglycinate on hydroxyapatite: role of solvents and ionic charge", *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 108, (1996), 277-285.
- [56] Mahmut Ozacar; "Equilibrium and kinetic modelling of adsorption of phosphorus on calcined alunite", *Adsorption*, Vol. 9, (2003), 125-132.
- [57] A.Yin, H.C.Margolis, J.Grogan, Y.Yao, and R.F.Troxler; "Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins", *Archives of Oral Biology*, Vol. 48, (2003), 361-368.
- [58] Anabel Lopez-Macipe, Jaime Gomez-Morales, and Rafael Rodriguez-Clemente; "The role of pH in the Adsorption of citrate ions on Hydroxyapatite", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 200, (1998), 114-120.
- [59] Mahmut Ozacar and I.Ayhan Sengil; "Adsorption of acid dyes from aqueous solutions by calcined alunite and granular activated carbon", *Adsorption*, Vol. 8, (2002), 301-308.
- [60] Paul C.Hiemenz and Raj Rajagopalan; "Principles of colloid and surface chemistry", *Third Edition*, (2004), 331-338.
- [61] William M.Chirdon, William J.O'Brien, and Richard E.Robertson; "Adsorption of Catechol and Comparative solutes on hydroxyapatite", *J. Biomed. Mat. Res. Part B: Appl Biomater*, Vol. 66B, (2003), 532-538.

- [62] Gamal M.S.El Shafei and Nabawaya A.Moussa; "Adsorption of some essential amino acids on hydroxyapatite", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 238, **160**, (2001), 166.
- [63] Lhaj Benaziz, Allal Barroug, Ahmed Legrouri, and Christian Rey and Albert Lebugle; "Adsorption of o-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline apatite", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 238, (2001), 48-53.
- [64] N.Bouropoulos and J.Moradian-Oldak; "Analysis of Hydroxyapatite Surface coverage by Amelogenin Nanospheres following the Langmuir Model for protein adsorption", *Calcif. Tissue Int*, Vol. 72, (2003), 599-603.
- [65] Enrique D.Vega, Griselda E.Narda, and Ferdinando H.Ferretti; "Adsorption of citric from dilute aqueous solutions by hydroxyapatite", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 268, (2003), 37-42.
- [66] Jaime Tapia Sanhueza; "Metodos de remoção de cromo de aguas residuais", *Capitulo V*, (2005), 1-13.
- [67] Keith K.H.Choy, Gordon McKay, and Jonh F.Porter; "Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon", *Resources, Conservation and Recycling*, Vol. 27, (1999), 57-71.
- [68] A.Barroug, L.T.Kuhn, L.C.Gerstenfeld, and M.J.Glimcher; "Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release", *Journal of Orthopaedic Research*, (2003),
- [69] Hiroyuki Yoshida and Koji Fujita; "Fabrication of Hard Dextran DEAE: Adsorption equilibria of BSA", *Adsorption*, Vol. 5, (1999), 63-71.
- [70] M.M: Abou-Mesalam; "Applications of Inorganic Ion Exchangers: II- Adsorption of some heavy Metal ions from Their aqueous waste solution using synthetic iron (III) titanate", *Adsorption*, Vol. 10, (2004), 87-92.
- [71] M.Doula, A.Ioannou, and A.Dimirkou; "Thermodynamics of copper adsorption-desorption by Ca-kaolinite", *Adsorption*, Vol. 6, (2000), 325-335.
- [72] Jufang Wu, Marianne E.Strömqvist, and Lars-Gunnar Hammarmarström; "A systematic approach for modelling the affinity coeficiente in the Dubinin-Radushkevich equation", *Carbon*, Vol. 40, (2002), 2587-2596.
- [73] Ahmet Çabuk, Tamer Akar, and Özge Tabak; "Biosorption characteristics of Bacillus sp. ATS-2 immobilized in silica gel for removal pf PB (II)", *Journal of Hazardous Materials*, **1**, (2006), 7.

- [74] J.Medek, Z.Weishauptová, and L.Kovár; "Combined isotherm of adsorption and absorption on coal and differentiation of both processes", *Microporous and Mesoporous Materials*, Vol. 89, (2006), 276-286.
- [75] I.Fernández-Moralez, M.Domingo García, and F.J.Lopez-Garzón; "PET as precursors of microporous carbons: preparation and characterization", *Microporous and Mesoporous Materials*, Vol. 80, (2005), 107-115.
- [76] Phillip Pendleton; "Temperature influence of benzene adsorption by a microporous silica", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 277, (2000), 227-236.
- [77] Ming-Shen Chiou, Pang-Yen Ho, and Hsing-Ya Li; "Adsorption Behavior of Dye AAVN and RB4 in Acid Solutions on Chemically Cross-Linked Chitosan Beads", *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, Vol. 34, **6**, (2003), 625-634.
- [78] G.Annadurai and M.Chellapandian and M.R.V.krishnan; "Adsorption of reactive dye on chitin", *Environmental Monitoring Assessment of Science and Technology*, Vol. 59, (1999), 111-120.
- [79] G.Annadurai, S.Rajesh Babu, K.P.O.Mahesh, and T.Murugesan; "Adsorption and Biodegradation of phenol by chitosan-immobilized *Pseudomonas putida* (NICM 2174)", *Bioprocess Engineering*, Vol. 22, (2000), 493-501.
- [80] Ola Abdel Wahab, Amany El Sikaily, and Azza Khaled; "Use of rice husk for adsorption of direct dyes from aqueous solution: A case study of direct F. Scarlet", *Egyptian Journal of Aquatic Research*, Vol. 31, (2005), 1110-1122.
- [81] Y.S.Ho and G.Mckay; "Pseudo- second order model for sorption processes", *Process Biochemistry*, Vol. 34, (1999), 451-465.
- [82] Adnan Ozcar and A.Safa Ozcar; "Kinetics, isotherms and thermodynamics studies of adsorption of Acid blue 193 from aqueous solution onto natural spiroclites", *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1**, (2005), 8.
- [83] C.Namasivayam and K.Raganathan; "Removal Cd(II) from wastewater by adsorption on "waste"Fe (III)/Cr(III) hydroxide", *Water Research*, Vol. 29, **7**, (1995), 1737-1744.
- [84] Unemi, Norio, Kitazato, Kenji, Fujii, and Setsuro; "Method of and composition for delivering 5-fluorouracil to tumors", *US patent 4 371 535*, (1983),
- [85] Fujii, Setsuro, Unemi, Norio, Takeda, and Setsuo; "Anti-cancer composition for delivering 5-fluorouracil", *US patent 4 719 213*, (1988),

- [86] M.L.Pascu, B.Carstocea, M.Brezeanu, D.Gazdaru, L.Voicu, and A.Smarandache; "Studies on activated fluorouracil with optical beams, for use in the eye tumours treatment", *Romanian Reports in Physics*, Vol. 55, **3**, (2003), 270-274.
- [87] N.Kaiser, A.Kimpfler, U.Massing, A.M.Burger, H.H.Fiebig, M.Brandl, and R.Schubert; "5-Flourouracil in vesicular phospholipic gels for anticancer treatment: entrapment and release properties", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 256, (2003), 123-131.
- [88] Marieta Nichifor, Etienne H.Schacht, and Leonard W.Seymour; "Polymeric prodrugs of 5-fluorouracil", *Journal of Controlled Release*, Vol. 48, (1997), 165-178.
- [89] Barbara Blicharska and Teobald Kupka; "Theoretical DFT and experimental NMR studies on uracil and 5-fluorouracil", *Journal of Molecular Structure*, Vol. 613, (2002), 153-166.
- [90] W.Wattanatorn, H.L.Mcleod, J.Cassidy, and K.E.Kendle; "High-performance liquid chromatographic assay of 5-fluorouracil in human erythrocytes, plasma and whole blood", *Journal of chromatography B*, Vol. 692, (1997), 233-237.
- [91] G.D.Guerra, P.Cerrai, and M.Tricoli; "Release of 5-fluorouracil by biodegradable poly(ester-ether-ester)s. PartI: release by fused thin sheets", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 12, (2001), 313-317.
- [92] Jonh M.Quigley and David G.Lloyd; "A topological study of prodrugs of 5-fluorouracil", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 231, (2002), 241-251.
- [93] Soo Peang Khor, Herb.Amyx, Stephen T.Davis, Donald Nelson, David P.Baccanari, and Thomas Spector; "Dihydropyrimidine dehydrogenase inactivation and 5-fluorouracil pharmacokinetics: allometric scaling of animal data, pharmacokinetics and toxicodynamics of 5-fluorouracil in humans", *Cancer Chemother Pharmacol*, Vol. 39, (1997), 233-238.
- [94] Feng Qian, Norased Nasongkla, and Jinming Gao; "Membrane-encased polymer milirods for sustained release of 5-flourouracil", *J. Biomed. Mat. Res.*, Vol. 61, (2002), 203-211.
- [95] Anshul Gupte and Kadriye Ciftci; "Formulation and Characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres", *International Journal of Pharmaceutics*, **276**, (2004), 93-106.
- [96] Majad Hussain, Gary Beale, Marcus Hughes, and Saghir Akhtar; "Co-delivery of an antisense oligonucleotide and 5-fluorouracil using sustained release poly(lactide-co-glycolide) microsphere formulations for potential combination therapy in cancer", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 234, (2002), 129-138.

- [97] B.Arica, S.Çalis, H.S.Kas, M.F.Sargon, and A.A Hincal; "5-Flourouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 242, (2002), 267-269.
- [98] E.Fournier, C.Passirani, A.Vonarbourg, L.Lemaire, N.Colin, S.Sagodira, P.Menei, and J.-P.Benoit; "Therapeutic efficacy study of novel 5-FU-loaded PMM 2.1.2-based microspheres on C6 glioma", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 268, (2003), 31-35.
- [99] Zuifang Liu and Stephen Rimmer; "Synthesis and release of 5-fluorouracil from poly(N-vinylpyrrolidinone) bearing 5-fluorouracil derivatives", *Journal of Controlled Release*, Vol. 81, (2002), 91-99.
- [100] Alain Merkli, jorge Heller, Cyrus Tabatabay, and Robery Gurny; "The use of acidic and basic excipients in the release of 5-fluorouracil and mitomycin C from a semi-solid bioerodible poly (ortho ester)", *Journal of Controlled Release*, Vol. 33, (1995), 415-421.
- [101] S.Y.Ng, H.R.Shen, E.Lopez, Y.Zherebin, J.Barr, E.Schacht, and J.Heller; "Development of a poly(ortho ester) prototype with a latent acid in the polymer backbone for 5-flourouracil delivery", *Journal of Controlled Release*, Vol. 65, (2000), 367-374.
- [102] Alf Lamprecht, Hiromitsu Yamamoto, Hirofumi Takeuchi, and Yoshiaki Kawashima; "Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil", *Journal of Controlled Release*, Vol. 90, (2003), 313-322.
- [103] Walter Wolf, Cary A.Presant, and Victor Waluch; "¹⁹F-MRS studies of fluorinated drugs in humans", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 41, (2000), 55-74.
- [104] Cees J.Van Groeningen, Godefridus J.Peters, Jan H.Schornagel, Helen Gall, Paul Noordhuis, Martin J.de Vries, Sue L.Turner, Martha S.Swart, Herbert M.Pinedo, and Axel R.Hanauske and Giuseppe Giaccone; "Phase I Clinical and pharmacokinetic Study of Oral S-1 in Patients with advanced solid tumors", *Journal of clinical Oncology*, Vol. 18, **14**, (2000), 2772-2779.
- [105] Lech Celewicz; "Photochemical reactions of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine with N^α-acetyl-L-tryptophan N- ethylamine in aqueous solution", *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Vol. Biology 43, (1998), 66-72.
- [106] A.E.Burgos, J.C.Belchior, and R.D.Sinisterra; "Controlled release of rhodium (II) carboxylates and their association complexes with cyclodextrins from hydroxyapatite matrix", *Biomaterials*, Vol. 23, (2002), 2519-2526.
- [107] Philippe Laffargue, Patrick Frayssinet, Mohamed Rtaimate, and Hartmut F.Hildebrand; "Adsorption and release of insulin-like growth factor-I on porous tricalcium phosphate implant", *John Wiley & Sons*, Vol. 49, (2000), 415-421.

- [108] H.Gautier, j.Guicheux, G.Grimandi, A.Faivre-Chauvet, G.Daculsi, and C.Merle; "In vitro influence of apatite-granules-specific area on human growth hormone loading and release", *J. Biomed. Mat. Res.*, Vol. 40, (1998), 606-613.
- [109] bajpai, Praphulla K., Graves, and George A.; "Porous ceramics for controlled release of proteins, polypeptide hormones, and other substances within human and/or other mamillian species and method", *US patent 4 218 255*, (1980),
- [110] bajpai and Praphulla K.; "ZCAP Ceramics", *US patent 4 778 471*, (1988),
- [111] bajpai and Praphulla K.; "ZCAP Ceramics", *US patent 4 778 471*, (1988),
- [112] M.Itokazu, M.Esaki, K.Yamamoto, T.Tanemori, and T.Kasai; "Local drug delivery system using ceramics: vacuum method for impregnating a chemotherapeutic agent into a porous hydroxyapatite block", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 10, (1999), 249-252.
- [113] Mansho Itokazu, Tadashi Sugiyama, Takatoshi Ohno, Eiji Wada, and Yoshihiro Katagiri; "Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 39, (1998), 536-538.
- [114] D.J.A.Netz, P.Sepulveda, V.C.Pandolfelli, A.C.C Spadaro, J.B.Alencastre, M.V.L.B.Bentley, and J.M.Marchetti; "Potencial use of gelcasting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 213, (2001), 117-125.
- [115] A.Lebugle, A.Rodrigues, P.Bonnevialle, J.J.Voitg, P.Canal, and F.Rodrigues; "Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate", *Biomaterials*, Vol. 23, (2002), 3517-3522.
- [116] M.Irngartinger, V.Camuglia, M.Damm, J.Goede, and H.W.Frijlink; "Pulmonary delivery of therapeutic peptides via dry power inhalation: effects of micronisation and manufacturing", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2004),
- [117] Hartwig Steckel and Heike G.Brandes; "A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 278, (2004), 187-195.
- [118] Kristina Stahl, Malin Claesson, Pontus Lilliehorn, Helena Lindén, and Kjell Backstrom; "The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 233, (2002), 227-237.
- [119] Said Kimakhe, Sylvain Bohic, Catherine Larrose, Alain Reynaud, Paul Pilet, Bernard Giumelli, Dominique Heymann, and Guy Daculsi; "Biological activities of sustained

polymyxin B release from calcium phosphate biomaterial prepared by dynamic compaction: An in vitro study", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 47, (1999), 18-27.

[120] R.P.del Real, S.Padilla, and M.Vallet-Regí; "Gentamicin release from hydroxyapatite/poly(ethylmethacrylate)/poly(methyl methacrylate) composites", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 52, (2000), 1-7.

[121] L.Obadia, G.Amador, G.Daculsi, and J.-M.Bouler; "calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin", *Biomaterials*, Vol. 24, (2003), 1265-1270.

[122] H.Gautier, J.Caillon, A.M.Le Ray, G.Daculsi, and C.Merle; "Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 52, (2000), 308-314.

[123] A.C.Queiroz, J.D.Santos, F.J.Monteiro, I.R.Gibson, and J.C.Knowles; "Adsorption and release studies of sodium ampicilin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites", *Biomaterials*, Vol. 22, (2001), 1393-1400.

[124] A. U. Y.Yamashita, T.Yamakawa, Y.Shito, N.Araki, and K.Kato; "Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic", *International Orthopaedics*, Vol. 22, (1998), 247-251.

[125] Hai H.Pham, Ping Luo, and François Génin and Alekha K.Dash; "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Ciprofloxacin Delivery Systems by Precipitation and Spray Drying Technique", *AAPS PharmSciTech*, Vol. 3, (2002), 1-9.

[126] Vladimir S.Komlev, Serguei M.Barinov, and Elena V.Koplik; "A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release", *Biomaterials*, Vol. 23, (2002), 3449-3454.

[127] A.Krajewski, A.Ravaglioli, E.Roncari, and P.Pinasco; "Porous ceramic bodies for drug delivery", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 12, (2000), 763-771.

[128] Willi Paul, Jerry Nesamony, and Chandra P.Sharma; "Delivery of insulin from hydroxyapatite ceramic microspheres: Preliminary in vivo studies", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 61, (2002), 660-662.

[129] Carl A.Kirker-Head; "Potencial applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 43, (2000), 65-92.

- [130] Julia E.Babensee and Larry V.Mcintire and G.Mikos; "Growth Factor Delivery for Tissue Engineering", *Pharmaceutical Research*, Vol. 17, **5**, (2000), 497-504.
- [131] Elizabeth L.Hedberg, Andrew Tang, Roger S.Crowther, Darrell H.Carney, and Antonios G.Mikos; "Controlled release of an osteogenic peptide from injectable biodegradable polymeric composites", *Journal of Controlled Release*, Vol. 84, (2002), 137-150.
- [132] Kazuhiko Kandori, Kaori Miyagawa, and Tatsuo Ishikawa; "Adsorption of immunogamma globulin onto various synthetic calcium hydroxyapatite particles", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 273, (2004), 406-413.
- [133] Erick M.Santos, Shulamith Radin, Bruce J.Shenker, Irving M.Shapiro, and Paul Ducheyne; "Si-Ca-P xerogels and bone morphogenetic protein act synergistically on rat stromal marrow cell differentiation in vitro", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 41, (1998), 87-94.
- [134] J.Siepmann, N.Faisant, J.Akiki, J.Richard, and J.P.Benoit; "Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory", *Journal of Controlled Release*, Vol. 96, (2004), 123-134.
- [135] T.Matsumoto, M.Okazaki, M.Inoue, S.Yamaguchi, T.Kusunose, T.Toyonaga, Y.Hamada, and J.Takahashi; "Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein", *Biomaterials*, (2004),
- [136] Y.Kuboki, H.Takita, D.Kobayashi, E.Tsuruga, M.Inoue, M.Murata, N.Nagai, and Y.Dohi; "BMP- Induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis", *John Wiley & Sons J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 39, (1998), 190-199.
- [137] C.T.Laurencin, M.A.Attawia, L.Q.Lu, M.D.Borden, H.H.Lu, W.J.Gorum, and J.R.Lieberman; "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2 producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration", *Biomaterials*, Vol. 22, (2001), 1271-1277.
- [138] M.Martins; "Chemical preparation and properties of calcium phosphate based materials for biomedical applications", *Tese de Mestrado da Universidade de Aveiro*, (2004),
- [139] S.Koutsopoulos; "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods", *Wiley Periodicals, Inc*, (2002), 600-612.
- [140] Milenko Markovic, Bruce O.Fowler, and Ming S.Tung; "Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material",

Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, Vol. 109, **6**, (2004), 553-568.

[141] S.Raynaud, E.Champion, D.Bernache-Assollant, and P.Thomas; "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis characterisation and thermal stability of powders", *Biomaterials*, Vol. 23, (2002), 1065-1072.

[142] Haibo Wang, Jong-Kook Lee, Amr Moursi, and John J.Lannutti; "Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite *in vitro*", *Wiley InterScience*, (2003), 599-608.

[143] Luo and Ping; "Methods of synthesizing hydroxyapatite powders and bulk materials", *US patent 5 858 318*, (1999),

[144] S.Nicolopoulos, J.M.González-Calbet, M.P.Alonso, M.T.Gutierrez-Ríos, and M.I.de Frutos and M.Vallet-Regí; "Characterization by TEM of Local Crystalline Changes during Irradiation Damage of Hydroxyapatite Compounds", *Journal of Solid State Chemistry*, Vol. 116, (1995), 265-274.

[145] José Fernandes de Oliveira Ugarte, Lidia Ágata de Sena, Carlos André de Castro Pérez, Paula Fernandes de Aguiar, Alexandre Malta Rossi, and Glória Almeida Soares; "Influence of processing parameters on structural characteristics of porous calcium phosphate samples: a study using an experimental design method ", *Mat. Res.*, Vol. 8, **1**, (2005), 71-76.

[146] J.-L. H. C. Y. S. Y.Pan; "Preparation of B- TCP with high thermal stability by solid reaction route", *Journal of Materials Science*, Vol. 38, (2003), 1049-1056.

[147] Bio-Rad; "KnowItAll® Academic Edition", Vol. <http://www.knowitall.com/academic/welcome.html>, (2005),

[148] X.Fan, D.J.Parker, and M.D.Smith; "Adsorption Kinetics of fluoride on low cost materials", *Water Research*, Vol. 37, (2003), 4929-4937.

[149] Franz-Georg Simon, Vera Biermann, Chistian Segebade, and Martina Hedrich; "Behaviour of Uranium in Hydroxyapatite-bearing permeable reactive barriers: investigation using ^{237}U as a radioindicator", *Science of the Total Environment*, Vol. 326, (2004), 249-256.

[150] Adriyan S.Milev and G.S.Kamali Kannangara and Michael A.Wilson; "Template-Directed Synthesis of hydroxyapatite from a Lamellar Phosphonate", *Langmuir*, Vol. 20, (2004), 1888-1894.

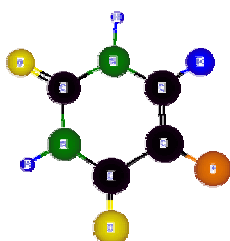
[151] Pirmin C.Hidber and Thomas J.Graule and Ludwig J.Gauckler; "Citric Acid- A dispersant for aqueous Alumina suspensions", *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 79, **7**, (1996), 1857-1867.

- [152] Y.S.R.Krishnaiah, V.Satyanarayana, B.Dinesh Kumar, and R.S.Karthikeyan; "In vitro drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **16**, (2002), 185-192.
- [153] D.Bhadra, S.Bhadra, S.Jain, and N.K.Jain; "A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil", *International Journal of Pharmaceutics*, **257**, (2003), 111-124.
- [154] V.K.Rastogi, Chattar Singh, and Vaibhav Jain and M.Alcolea Palafox; "FTIR and FT-Raman spectra of 5-methyluracil (thymine)", *Journal of Raman Spectroscopy*, Vol. 31, (2000), 1005-1012.
- [155] Fabian Peters and Matthias Epple; "Crystallisation of calcium phosphates under constant conditions with a double diffusion set-up", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **3585**, (2001), 3592.
- [156] Haitong Zeng, Krishnam K.Chittur, and William R.Lacefield; "Dissolution/precipitation of calcium phosphate thin films produced by ion beam sputter deposition technique", *Biomaterials*, Vol. 20, (1999), 443-451.
- [157] Soon-HO Kwon, Youn-Ki Jun, Seong-Hyeon Hong, and Hyoun-Ee Kim; "Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders", *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 23, (2003), 1039-1045.
- [158] Annie John and H.K.Varma and T.V.Kumari; "Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system", *Journal of Biomaterials applications*, Vol. 18, (2003), 63-78.

Anexo 1

Cálculo do tamanho da molécula de 5-FU com o programa de computador CS chem3D Pro versão 4.0.1

Para o cálculo do tamanho da molécula de 5-Flourouracil, utilizou-se o programa de computador CS Chem3D Pro, um programa standard, que permite otimizar a estrutura química da molécula em termos de energias. Primeiro desenhou-se a molécula de 5-FU num formato 3D. De seguida optimizou-se em termos energéticos mínimos a molécula. Os parâmetros utilizados para a optimização da estrutura da molécula foram:



Minimum RMS gradient = 0.1
Potential function = MNDO

Figura 72- Representação 3D da molecula 5-FU obtida pelo programa CS chem3D Pro

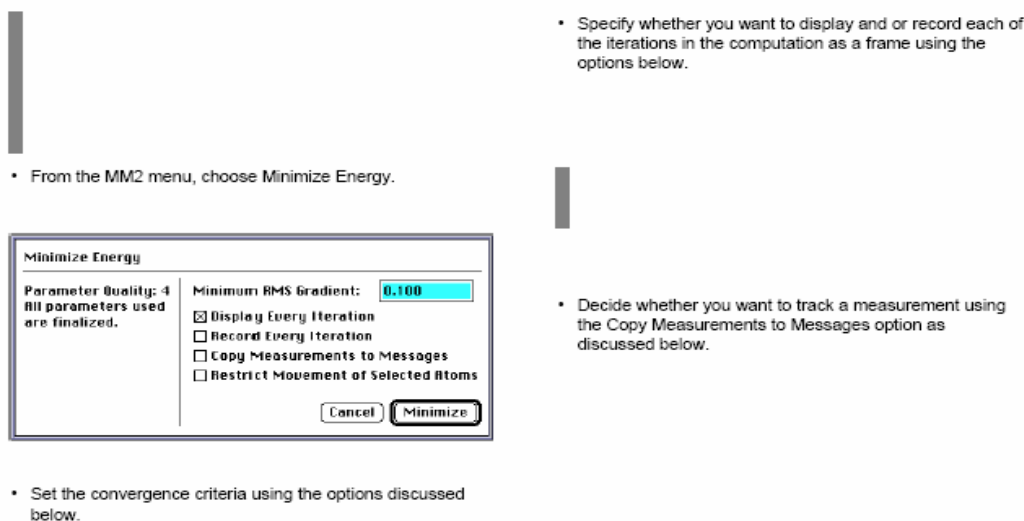


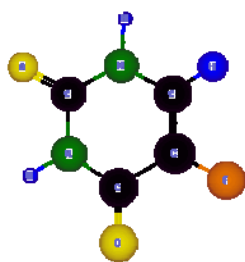
Figura 73- Página do programa com o esquema de obtenção da energia mínima para uma dada molécula

Após a optimização da estrutura mediu-se as distancias interatómicas da estrutura resultante do cálculo.

Anexo 1

Cálculo do tamanho da molécula de 5-FU com o programa de computador CS chem3D Pro versão 4.0.1

Para o cálculo do tamanho da molécula de 5-Flourouracil, utilizou-se o programa de computador CS Chem3D Pro, um programa standard, que permite otimizar a estrutura química da molécula em termos de energias. Primeiro desenhou-se a molécula de 5-FU num formato 3D. De seguida optimizou-se em termos energéticos mínimos a molécula. Os parâmetros utilizados para a optimização da estrutura da molécula foram:



Minimum RMS gradient = 0.1
Potential function = MNDO

Figura 1- Representação 3D da molécula 5-FU obtida pelo programa CS chem3D Pro

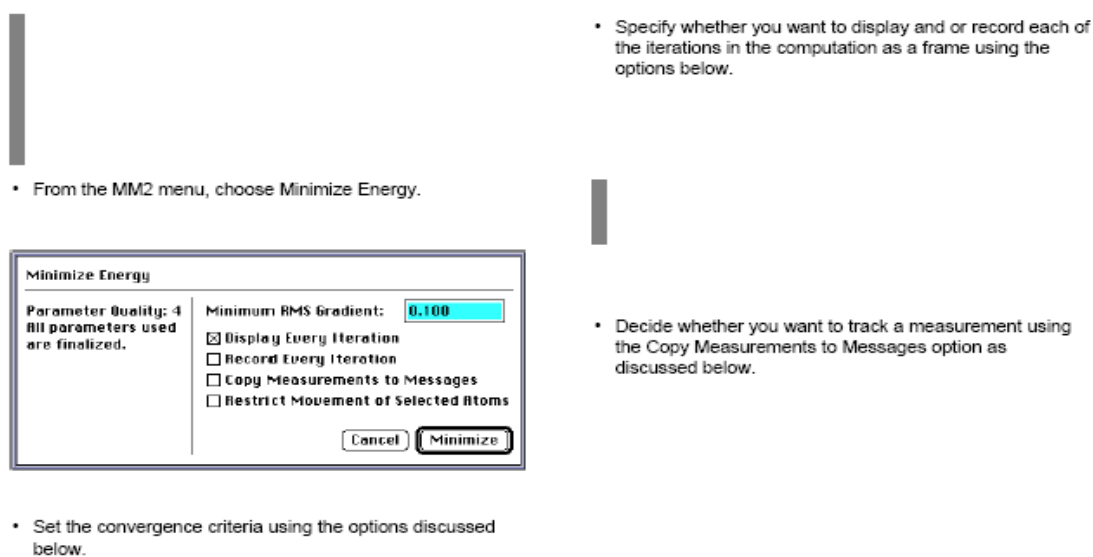


Figura 2- Página do programa com o esquema de obtenção da energia mínima para uma dada molécula

Após a optimização da estrutura mediu-se as distancias interatómicas da estrutura resultante do cálculo.